

Farmakodynamiske biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte

*Metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, purinbaser og cytokiner
som mulige markører for effekten av
immundempende legemidler*

Masteroppgave i farmakologi

Christine Berg



Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Avdeling for medisinsk biokjemi

Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

15.mai 2012

Masteroppgave i farmakologi for graden Master i farmasi

Farmakodynamiske biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte



Christine Berg

Oppgaven er utført ved

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,

Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

Universitetet i Oslo

og

Avdeling for medisinsk biokjemi,

Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet, i tidsperioden august 2011 til mai 2012. Min eksterne veileder var forsker Nils Tore Vethe ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Professor Stein Bergan og professor Anders Åsberg har vært mine interne veiledere ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil minnes tiden på Rikshospitalet som spennende, utfordrende, morsom og ikke minst lærerrik. Hver dag har vært fylt med faglig spennende innhold og jeg har lært utrolig mye.

Først og fremst vil jeg takke min meget dyktige veileder Nils Tore. Tusen takk for all hjelp! Jeg setter så utrolig stor pris på den gode oppfølgingen og veiledningen jeg har fått gjennom hele masteroppgaven. Takk for alle innspill, gode ideer og verdifulle tilbakemeldinger både i laboratoriearbeidet og under skriveprosessen.

Jeg vil videre få takke Stein for godt samarbeid og alle faglige innspill underveis. Takk for mange inspirerende kollokvier og at du alltid tar deg tid til å hjelpe og svare på spørsmål.

Takk til forsker Sara Bremer, mastergradsstudent Lene Pham, stipendiat Ingjerd Sæves og resten av kollokviegruppen for mange fine møter og faglige diskusjoner. Jeg vil også få takke alle bioingeniørene på SAFE for et hyggelig og sosialt miljø med mange trivelige kaffe – og spisepauser. Dette er et år jeg sent vil glemme.

Jeg vil også få rette en takk til Pål-Dag Line og Morten Skauby ved Transplantasjonskirurgisk seksjon for samarbeidet og hjelp med prøveanskaffelse til pilotstudien.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og Marius for verdifull støtte under hele studietiden og for interessen dere har vist for arbeidet mitt.

Christine Berg

Rikshospitalet mai 2012

INNHold

FORKORTELSER	7
SAMMENDRAG	9
1 INNLEDNING	11
1.1 Organtransplantasjon	11
1.1.1 Nyretransplantasjon.....	12
1.2 Immunrespons	13
1.2.1 HLA-molekyler og vevsforlikelighet	13
1.2.2 Immunologiske prinsipper for avstøtning	14
1.3 Immundempende behandling	16
1.3.1 Glukokortikoider.....	17
1.3.2 Kalsineurinhemmere	18
1.3.3 mTOR-hemmere	19
1.3.4 IMP-dehydrogenasehemmer	20
1.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering	21
1.4.1 Farmakokinetisk monitorering.....	22
1.4.2 Farmakodynamisk monitorering	23
1.5 Biomarkører.....	24
1.5.1 Metabolsk aktivitet.....	25
1.5.2 IMPDH-aktivitet	26
1.5.3 Cytokiner	27
1.5.4 Purinbaser	28
1.6 Prinsipper for ex vivo immunaktivering	30
1.6.1 Phytohemagglutinin	31
1.6.2 Phorbol 12-myristat 13-acetat.....	31
1.6.3 Ionomycin.....	31
1.6.4 Stimulering via CD3/CD28	31
2 HENSIKT.....	32
3 MATERIALER	33
3.1 Utstyr.....	33
3.2 Reagenser	36
4 METODER	42
4.1 Metodeutvikling.....	42

4.2 Celleisolering.....	43
4.2.1 Mononukleære celler i perifert blod (PBMC)	43
4.2.2. CD4 ⁺ celler	44
4.2.3 Fullblod	45
4.3 Ex vivo aktivering av immunceller.....	45
4.3.1 Aktivering av PBMC.....	45
4.3.2 Aktivering av CD4 ⁺ celler	46
4.3.3 Aktivering av fullblod	47
4.4 Kvantifisering av molekulære biomarkører	47
4.4.1 Metabolsk aktivitet i PBMC og CD4 ⁺ celler	47
4.4.2 Purinbaser og IMPDH-aktivitet i PBMC og CD4 ⁺ celler.....	48
4.4.3 Cytokiner utskilt ved aktivering av fullblod, PBMC og CD4 ⁺ celler	51
4.5 Biomarkørenes respons på immundepende legemidler	53
4.6 Pilotstudie.....	55
4.7 Beregninger	56
5 RESULTATER	57
5.1 Utpøving av betingelser for ex vivo immunaktivering.....	57
5.5.1 Metabolsk aktivitet som biomarkør	57
5.5.2 IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører.....	65
5.5.3 Cytokiner som biomarkører.....	69
5.2 Effekter av immundepende legemidler på biomarkørene	73
5.2.1 Metabolsk aktivitet (WST-1) som biomarkør.....	73
5.2.2 IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører.....	74
5.2.3 Cytokiner som biomarkører.....	77
5.3 Etablerte betingelser for ex vivo immunaktivering	80
5.3.1 Kvantifisering av metabolsk aktivitet (WST-1)	80
5.3.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser	80
5.3.3 Nivå av cytokinutskillelse	80
5.4 Pilotstudie.....	81
5.4.1 Metabolsk aktivitet (WST-1) i ex vivo-aktiverte PBMC	81
5.4.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser som biomarkører.....	87
5.4.3 Cytokiner som biomarkører.....	89
6 DISKUSJON	94
6.1 Utpøving av betingelser for ex vivo immunaktivering.....	94

6.1.1 Metabolsk aktivitet (WST-1) som biomarkør.....	94
6.1.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser som biomarkør.....	97
6.1.3 Cytokiner som biomarkør.....	98
6.2 Effekter av immundempende legemidler på biomarkørene	100
6.2.1 Metabolsk aktivitet i PBMC fra friske personer	100
6.2.2 IMPDH-aktivitet i PBMC fra friske personer	102
6.2.3 Cytokiner i fullblod og PBMC fra friske personer	103
6.3 Pilotstudie.....	104
6.3.1 Metabolsk aktivitet i PBMC fra nyretransplanterte	104
6.3.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser i PBMC fra nyretransplanterte	106
6.3.3 Cytokiner i fullblod og PBMC fra nyretransplanterte.....	109
7 KONKLUSJON.....	114
REFERANSER	116
APPENDIX.....	121

FORKORTELSER

AMP	Adenosinmonofosfat
AP-1	Aktivator protein-1
APC	Antigenpresenterende celle
AUC _{0-4t}	Arealet under konsentrasjon-tidskurven 0-4 timer etter legemiddeldose
AUC _{0-12t}	Arealet under konsentrasjon-tidskurven 0-12 timer etter legemiddeldose
AUC _r	Arealet under konsentrasjon-tidskurven
C ₀	Konsentrasjon ved tid 0 (rett før inntak av legemiddeldose)
C ₂	Konsentrasjon 2 timer etter inntak av legemiddeldose
C _{maks}	Maksimal blodkonsentrasjon
ConA	Concanavalin A
CD3	Cluster of differentiation 3
CD28	Cluster of differentiation 28
CD4 ⁺ celler	Celler som uttrykker CD4
CD8 ⁺ celler	Celler som uttrykker CD8
CNI	Kalsineurininhibitor (kalsineurinhemmer)
CsA	Ciklosporin A
CYP	Cytokrom P450
dGDP	Deoksyguanosindifosfat
dGTP	Deoksyguanosintrifosfat
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FCS	Føtalt kalveserum
FKBP-12	FK506-bindende protein 12
GDP	Guanosindifosfat
GM-CSF	Granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor
GMP	Guanosinmonofosfat
GTP	Guanosintrifosfat
GR	Glukokortikoidreseptor
HLA	Humant leukocytantigen (<i>human leucocyte antigen</i>)
IFN- γ	Interferon- γ

IL	Interleukin
IMP	Inosinmonofosfat
IMPDH	Inosinmonofosfat dehydrogenase
KCl	Kaliumklorid
LC-MS/MS	Væskeskromatografi koblet til tandem massespektrometri
m/z	Masse/ladning
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMF	Mykofenolat mofetil
MPA	Mykofenolsyre (mykofenolat)
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NK-celler	<i>Natural killer cells</i>
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NFκB	Nukleær faktor κB
NFAT	Nukleær faktor for aktiverte T-celler
PBMC	Mononukleære celler i perifert blod (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PE	Phycoerythrin
P-gp	P-glykoprotein
PKC	Protein kinase C
PBS	Fosfatbufret saltvann (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PRPP	Fosforibosylpyrofosfat
REK	Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RNA	Ribonukleinsyre
SA-PE	Streptavidin-phycoerythrin
t ₀	Tidspunkt rett før inntak av legemiddeldose
t _{1,5}	Tidspunkt 1,5 timer etter legemiddeldose
TCR	T-celle reseptor
TDM	Terapeutisk legemiddelmonitorering (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
TNF-α	Tumor nekrose faktor- α
Tris-HCl	Tris-hydroklorid
VK	Variasjonskoeffisient
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium salt-1</i>
XMP	Xantosin monofosfat

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Transplanterte pasienter bruker kombinasjoner av immundempende legemidler for å hindre avstøtningsepisoder. På grunn av store farmakokinetiske forskjeller mellom pasientene styres den immundempende behandlingen vanligvis ved å måle legemiddelnivåene i blod eller plasma. Det er i tillegg vist betydelige variasjoner i legemidlenes molekylære respons. Det er derfor mulig at immundempende behandling kan individualiseres ytterligere ved å måle molekylære farmakodynamiske biomarkører.

Hensikt: Formålet med dette delprosjektet var å utvikle metoder for kvantifisering av biomarkører i *ex vivo* aktiverte immunceller. Metabolsk aktivitet (WST-1), inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH)-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse skulle undersøkes som potensielle biomarkører. Videre skulle det undersøkes om metodene egnet seg til å måle de immundempende legemidlenes effekter på biomarkørene. Biomarkørene skulle kvantifiseres i blodprøver fra nyretransplanterte pasienter ved hjelp av de etablerte metodene. Det overordnede formålet var å frembringe ny kunnskap om virkningsmekanismene til de immundempende legemidlene, samt å identifisere potensielle biomarkører som kan predikere kliniske effekter av immundempende legemidler hos transplanterte pasienter.

Metoder: Ulike prinsipper for *ex vivo* immunaktivering av lymfocytter ble testet ut med cellemateriale fra friske personer. Fullblod og isolerte mononukleære celler i perifert blod (PBMC) ble aktivert med ulike kombinasjoner av mitogenene phytohemagglutinin (PHA-L), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) og ionomycin. Isolerte CD4⁺ celler (T-celler) ble aktivert med antistoffer mot CD3- og CD28-reseptorene. Cellene ble inkubert inntil 72 timer. Lymfocytters aktiveringsgrad ble kvantifisert etter tilsetning av tetrazoliumsaltet WST-1. IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ble kvantifisert ved hjelp av LC-MS/MS og cytokiner ble analysert ved bruk av et multiplex-assay som er basert på fluorescensmerkede antistoffer. Biomarkørene ble kvantifisert i blodprøver fra nyretransplanterte pasienter som var inkludert i en pilotstudie. Pasientenes sensitivitet overfor immundempende legemidler ble testet ut før transplantasjon ved hjelp av legemiddelresponskurver med metabolsk aktivitet (WST-1) som markør. Metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble kvantifisert både før transplantasjon og ved to studiedager etter transplantasjon.

Resultater: PMA og ionomycin var best egnet som stimulanter for PBMC med inkuberingstid på 72 timer for kvantifisering av metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser. Det var tydelig forskjell i respons mellom aktiverte og ikke-aktiverte celler og forsøkene hadde god målepresisjon. Tilsvarende resultater ble observert for både CD4⁺ celler og PBMC, men PBMC ble valgt på grunn av enklere isoleringsprosess og høyere celleutbytte. Det var mulig å erstatte kalveserum i inkuberingsmediet med heparin-plasma fra klinisk prøve. Både fullblod og PBMC egnet seg som cellemateriale til cytokinanalyse.

Metabolsk aktivitet (WST-1) viste seg å fungere som en generell markør på immunsuppresjon da effektene de immundempende legemidlene hadde på biomarkørene ble undersøkt. Legemiddelresponskurver av akseptabel kvalitet ble konstruert der aktiveringsgraden ble nedsatt med økende konsentrasjon av legemidlene. Flere av de immundempende legemidlene hadde effekt på IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse i aktiverte PBMC.

Det var store interindividuelle variasjoner mellom de fem nyretransplanterte pasientene som ble inkludert i pilotstudien. Det var mulig å konstruere responskurver for ciklosporin A, takrolimus, mykofenolat, sirolimus og everolimus. Responskurvene for prednisolon viste et usystematisk forløp og var av dårlig kvalitet. Mykofenolat hadde størst effekt på aktiveringsgraden. Aktiveringsgrad, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse var høyest før transplantasjon og ble nedsatt i varierende grad ved 6-9 dager og 5-7 uker etter transplantasjon. Det var generelt liten forskjell i aktiveringsgrad og purinbaser rett før legemiddeldose og 1,5 timer etter legemiddeldose. IMPDH-aktivitet og cytokinutskillelse var i større grad redusert ved 1,5 timer etter dose.

Konklusjon: Det ble utviklet metoder for *ex vivo* immunaktivering av PBMC og fullblod.

Metodene kunne anvendes for å måle effekter de immundempende legemidlene har på metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse under en immunaktivering. Alle de undersøkte biomarkørene varierte i stor grad mellom pasientene. Det var mulig å konstruere individuelle responskurver for ciklosporin A, takrolimus, mykofenolat, sirolimus og everolimus basert på aktiverte PBMC før transplantasjon. Både absolutte og relative nivåer av biomarkørene vil være aktuelle å korrelere til immundempende legemiddeleksponering og klinisk utfall når data fra hele studiepopulasjonen foreligger.

1 INNLEDNING

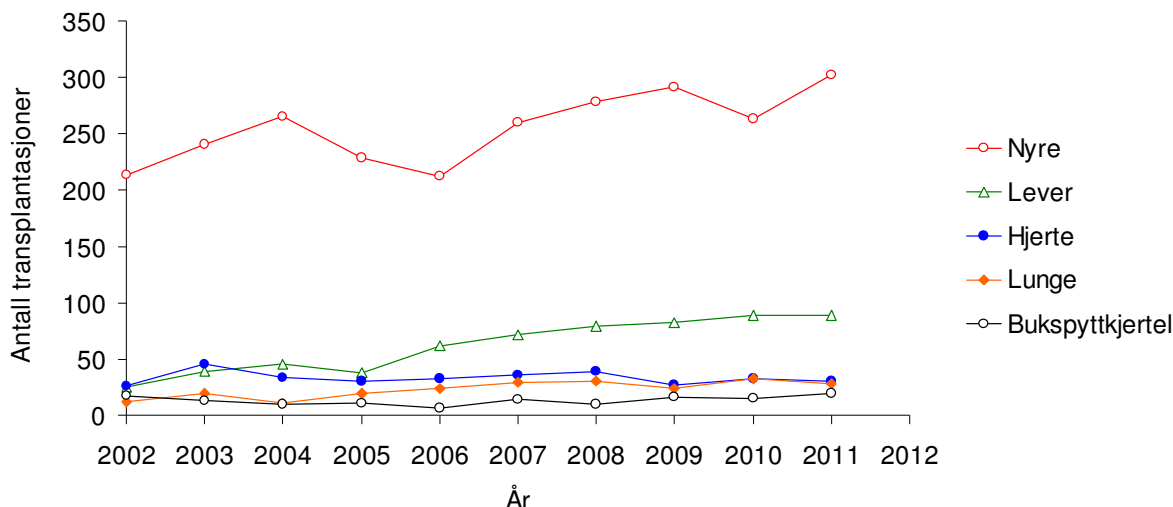
1.1 Organtransplantasjon

Med transplantasjon menes overføring av celler, vev eller organer. Overføringen kan skje fra et individ til et annet (allotransplantasjon), fra et sted på kroppen til et annet hos samme person (autotransplantasjon) eller fra dyr til menneske (xenotransplantasjon). De vanligste transplantasjonene av celler og vev er henholdsvis stamcelletransplantasjon og hudtransplantasjon. Organtransplantasjon omfatter overføring av et friskt organ fra en person til en annen (1).

I lang tid hadde den medisinske profesjonen håpet på å kunne erstatte organer og vev som bar preg av sykdom, ødeleggelse og funksjonsnedsettelse. Tre grunnleggende problemer måtte løses for å gjennomføre det de håpet på. I første omgang måtte transplantatet bli introdusert på en slik måte at deres normale funksjon ble opprettholdt. Videre måtte helsen til den personen som mottar transplantatet bli opprettholdt under operasjonen og andre prosedyrer som en transplantasjon innebærer. Etter gjennomført transplantasjon måtte immunsystemet til mottakeren bli hindret i å utvikle immunresponser som kunne føre til avstøtning av transplantatet, ødeleggelse av friskt vev eller andre komplikasjoner (2).

I 1956 ble den første vellykkede organtransplantasjonen i Norden foretatt ved Rikshospitalet i Norge. En nyre ble transplantert fra ubeslektet giver til pasient med nyresvikt (allogen transplantasjon mellom genetiske forskjellige individer). Nyren var både allogen og ABO-blodtype uforlikelig, men pasienten levde i 30 dager med sin nye nyre. Som immunsuppresjon for å hindre avstøtning ble det brukt helkroppsbestråling og kortison (3).

Andre organer som i dag transplanteres er lever, hjerte, lunger og bukspyttkjertel. I tillegg transplanteres insulinproduserende øyceller som eksperimentell behandling av diabetes. Organtransplantasjon har blitt et etablert behandlingstilbud til pasienter med terminal organsvikt, og stamcelletransplantasjon har vært med på å helbrede mange med malign blodsykdom (3). I løpet av 2011 ved Rikshospitalet ble det transplantert 302 nyrer (164 fra død og 83 fra levende giver), 89 leverer, 30 hjerter, 28 lunger og 20 bukspyttkjertler. Figur 1 viser en oversikt over antall transplantasjoner fordelt på organtype i Norge i periode 2002-2011 (4).



Figur 1. Antall transplantasjoner utført i Norge fra 2002-2011, fordelt på organtype. Tallene er hentet fra Årsrapport for organdonasjon og transplantasjon 31. januar 2010 - 31. desember 2011, Oslo universitetssykehus.

1.1.1 Nyretransplantasjon

Nyretransplantasjon er et alternativ for pasienter med kronisk nyresvikt av en slik grad at de har behov for nyreerstattende behandling (5). I Norge er de vanligste årsakene til kronisk nyresvikt vaskulære og hypertensive nyreskader (33 %). Andre årsaker er glomerulonefritt, diabetes nefropati, kronisk pyelonefritt/interstiell nefritt og polycystisk nyre. Langvarig og ubehandlet hypertensjon, samt diabetes mellitus type 1 og 2 er risikofaktorer for å utvikle nyresvikt (6).

Den første vellykkede nyretransplantasjonen ble utført i Boston i 1954 mellom to eneggede tvillinger (7). I Norge ble nyretransplantasjon et etablert behandlingstilbud for personer med nyresvikt ved begynnelsen av 1960-årene. Fra 1983 ble alle nyretransplantasjoner utført ved Rikshospitalet i Oslo som per i dag er et stort transplantasjonssenter i verdensmålestokk. Nyre er det organet som transplanteres hyppigst i Norge. Givere av nyre kan enten være levende eller nylig avdøde. Norge har vært ledende innenfor bruken av levende givere og ligger på verdenstoppen i forhold til folketall og antall nyretransplantasjoner. Ventetiden i Norge har av den grunn blitt kortere sammenliknet med andre land i verden (3).

1.2 Immunrespons

1.2.1 HLA-molekyler og vevsforlikelighet

Immunrespons mot det transplanterte vevet eller organet er forårsaket av genetiske forskjeller mellom giver og mottaker. De mest betydningsfulle forskjellene finnes i *major histocompatibility complex* (MHC) molekyler. MHC-molekyler er transmembrane glykoproteiner og har forskjellige navn hos ulike arter. Hos mennesker kalles MHC for *human leucocyte antigen* (HLA) kompleks. HLA-molekylene finnes i to utgaver, HLA klasse I og HLA klasse II. Vevsforlikelighetsantigener er en fellesbetegnelse på klasse I – og klasse II – molekylene og er mye brukt innenfor transplantasjonsimmunologi. Vevsforlikelighetsantigenene er med på å avgjøre om vev eller et organ blir akseptert av mottaker etter transplantasjon (8).

HLA-molekylene utviser stor grad av polymorfisme i befolkningen, og det vil si at det er høy forekomst av mange ulike allelvarianter i befolkningen. HLA-alleler kan påvises på DNA-nivå ved genotyping. Enkeltindivider uttrykker et sett med HLA-gener og dermed HLA-molekyler som nesten alltid er forskjellig fra andre individer. Den store graden av polymorfisme kan trolig forklares ved naturlig seleksjon av en kombinasjon av mutasjoner i HLA-gener i forbindelse med eksponering ovenfor infeksiose agens (8).

HLA-molekylene har i oppgave å binde peptidfragmenter fra intracellulære proteiner og presentere disse til T-cellenes antigenspesifikke reseptorer (TCR). HLA klasse I molekylene finnes på nesten alle kjerneholdige celler, mens HLA klasse II kun finnes på antigenpresenterende celler (APC). Dersom peptidene stammer fra et fremmed organ, en situasjon som forekommer ved transplantasjon, vil T-cellene vanligvis bli aktivert og skape en immunologisk reaksjon. HLA-molekylene virker som informasjonsmolekyler for T-celler. Ved transplantasjon vil en større grad av overensstemmelse mellom givers og mottakers HLA-molekyler resultere i færre og svakere avstøtningsreaksjoner. Giver velges ut i fra HLA-forlikelighet med mottaker. I tillegg er det viktig å ta hensyn til ABO-blodtypeantigener (8). Ved transplantasjon av nyre fra levende giver er ABO-forlikelighet ønskelig. HLA-identisk giver er det mest optimale, men dersom det ikke er et alternativ ønskes en giver som i stor grad samsvarer (*matcher*) med mottakeren (9).

1.2.2 Immunologiske prinsipper for avstøtning

Etter en allogen transplantasjon vil mottakerens immunsystem i ulik grad angripe det transplanterte organet. Avstøtning er et resultat av samspill mellom det medfødte og adaptive/erhvervede immunsystemet og kan føre til hyperakutt, akutt eller kronisk avstøtning. Avstøtningsreaksjonene klassifiseres i forhold til tidspunkt for avstøtningen og hvilke immunologiske mekanismer som er involvert. T-cellene spiller en sentral rolle i avstøtningsprosessen. Alloreaktive T-celler (T-celler som gjenkjenner fremmede alloantigener) aktiveres og kan enten ødelegge transplantatet direkte eller forsterke andre elementer ved immunresponsen som kan ødelegge transplantatet (10).

Det finnes flere gjenkjennelsesmekanismer som kan føre til avstøtning; direkte, indirekte og semi-direkte.

- a) Direkte gjenkjenning er karakterisert ved at giverens APC migrerer ut fra transplantatet til mottakerens lymfeknuter hvor de presenterer giver-peptider på sine egne HLA-komplekser, til TCR på mottakerens T-celler. Dette genererer en immunrespons rettet mot transplantatet og kan føre til avstøtning (10).
- b) Indirekte gjenkjenning foregår ved at mottakerens APC migrerer til transplantatet hvor de tar opp og prosesserer proteiner fra mottakkerens celler. Giverens peptider presenteres deretter av mottakerens HLA-kompleks til mottakerens T-celler som aktiveres og setter i gang en immunreaksjon mot transplantatet (10).
- c) Semi-direkte gjenkjenning er en krysning mellom direkte og indirekte gjenkjenning, og foregår ved at peptid:HLA-kompleks på giverens APC overføres til mottakerens APC gjennom celle-cellekontakt eller gjennom exosomer som fusjonerer med mottakerens APC cellemembran. Mottakerens APC presenterer alloantigene peptider til sine egne T-celler, som følgelig aktiveres og starter en immunreaksjon mot transplantatet (10).

Hyperakutt avstøtning

ABO-antigener er uttrykket på endotelceller i blodårer og er en viktig faktor ved transplantasjon av organer. Dersom giver og mottaker er uforlikelige med hensyn til ABO, vil organet umiddelbart avstøtes og det kan skje i løpet av minutter til noen få timer. Avstøtningen skyldes at mottakeren allerede har eksisterende antistoffer mot de fremmede antigenene som uttrykkes på endotelet i det transplanterte organet. Antistoffene binder til endotelet og trigger komplementsystemet i organet, noe som fører til celledød i endotelet, lokal koagulering og irreversibel avstøtning av organet. HLA klasse I molekyler finnes på overflaten til vaskulært endotel, så ved HLA-uforlikelighet vil eksisterende antistoffer mot disse molekylene i samme grad som for ABO-antigenen kunne utløse en hyperakutt avstøtning (11). Det er likevel mulig å fjerne eksisterende antistoffer fra blodomløpet hos en mottaker før transplantasjon, og da kan transplantasjon mellom f.eks. ABO-uforlikelige utføres uten at hyperakutt avstøtning inntreffer (12).

Akutt avstøtning

Akutt avstøtning inntreffer som regel i løpet av dager eller måneder etter transplantasjon. De fleste organtransplantasjoner foregår til en viss grad på tvers av HLA-klasse I og/eller II ulikheter mellom giver og mottaker. I en slik situasjon vil mottakerens T-cellepopulasjon inneholde kloner av alloreaktive T-celler som gjenkjenner den uforlikelige HLA allotypen til det transplanterte vevet eller organet. Celler som uttrykker CD8 (CD8⁺ celler) responderer på ulikheter i HLA-klasse I og celler som uttrykker CD4 (CD4⁺ celler) responderer på ulikheter i HLA klasse II. En alloreaktiv T-cellerespons vil føre til produksjon av effektorceller (CD4⁺ og CD8⁺) som kan angripe det transplanterte organet og ødelegge det. En akutt avstøtning kan reverseres ved hjelp av immundempende legemidler (2).

Kronisk avstøtning

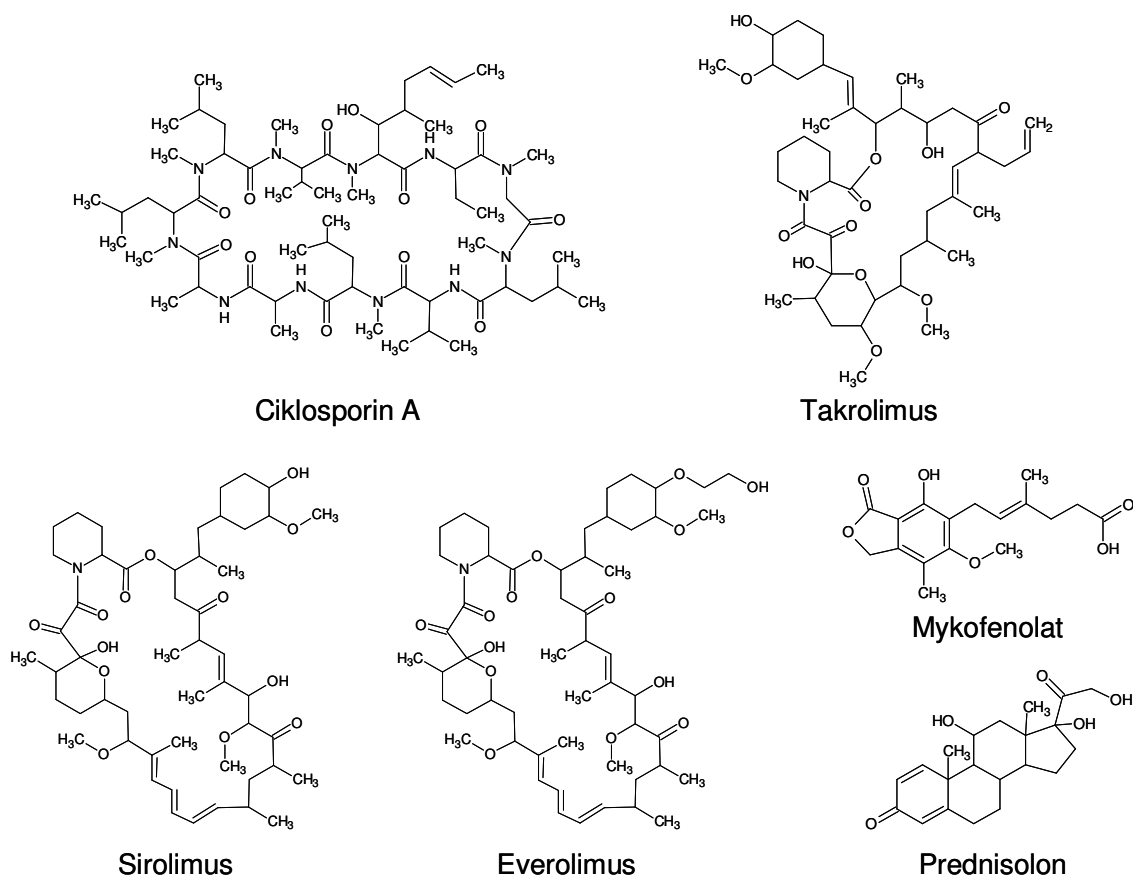
Kronisk avstøtning utvikles over tid og kan inntreffe måneder eller år etter transplantasjon. Kronisk avstøtning er korrelert med antistoffer som er spesifikke mot HLA-klasse I molekyler i transplantatet. Reaksjonen er karakterisert ved fortykkelse av blodåreveggen i transplantatet og blodårene får mindre indre diameter. Som følge blir blodtilførselen til organet redusert, noe som videre fører til iskemi og tap av organfunksjon, og med tiden vil organet dø (2).

1.3 Immundempende behandling

Etter en allotransplantasjon er det nødvendig med immundempende behandling for å undertrykke alloreaksjoner som ellers ville ført til avstøtning av det transplanterte organet. En kombinasjon av anti-inflammatoriske kortikosteroider, cytotoksiske legemidler som interfererer med syntesen av deoksyribonukleinsyre (DNA) og legemidler som hemmer signalveier i T-celleaktivering gjør det mulig å gjennomføre en vellykket allogen transplantasjon (2). Tidligere besto et immundempende behandlingsregime av uspesifikke steroider og cytotoksiske legemidler. Nå har man gått over til mer spesifikke immundempende legemidler som påvirker T-celleaktivering og T-cellenes funksjon. Cyklosporin A (CsA) er eksempel på et av de første spesifikke immundempende legemidlene som ble introdusert (13).

Etter transplantasjon består et standard vedlikeholdsregime som regel av tre legemidler: en kalsineurinhemmer (CNI: CsA eller takrolimus), et glukokortikoid (prednisolon) og inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH) - hemmeren mykofenolat (MPA). Hos enkelte brukes en hemmer av *mechanistic target of rapamycin* (mTOR-hemmer: sirolimus eller everolimus) enten i stedet for CNI eller i kombinasjon med CNI. Den immundempende behandlingen avhenger av hvilken organtype som transplanteres, tid etter transplantasjon og kliniske vurderinger hos den enkelte pasient.

Etter nyretransplantasjon er det vanlig med et trippelbehandlingsregime med en CNI (takrolimus eller CsA), MPA og steroider (metylprednisolon innledningsvis, deretter prednisolon). Alle nyretransplanterte starter nå med takrolimus, unntatt de som har nedsatt glukose-toleranse. Under operasjon og i tidlig fase etter transplantasjon (4 dager) er det vanlig å bruke basiliximab, som er et antistoff rettet mot interleukin (IL)-2 reseptoren. På denne måten blokkerer antistoffet binding av IL-2 til reseptoren som er et viktig signal i T-celleproliferasjonen i den cellulære immunresponsen som er involvert i blant annet avstøtningsreaksjoner (9,14).



Figur 2. Molekylstrukturer for de immundepende legemidlene ciklosporin A, takrolimus, sirolimus, everolimus, mykofenolat og prednisolon.

1.3.1 Glukokortikoider

Prednisolon og metylprednisolon er syntetiske derivater som virker anti-inflammatorisk og immundepende. Sammenliknet med kortisol som dannes naturlig i binyrebarken, har prednisolon fire ganger sterkere anti-inflammatorisk virkning. Glukokortikoidene har en rekke fysiologiske effekter og har innvirkning på de fleste cellene i kroppen, ikke bare lymfocytene (2). Disse legemidlene medierer sin effekt gjennom glukokortikoidreseptoren (GR). GR er en ligand-aktivert transkripsjonsfaktor og medlem av kjernereseptorfamilien. Etter at steroidet (liganden) binder seg til GR, vil ligand:reseptorkomplekset dissosiere fra *heat shock protein 90* og translokere til kjernen hvor de regulerer genuttrykket av cytokiner og andre inflammatoriske mediatorer. Glukokortikoidene nedregulerer transkripsjonen av proinflammatoriske mediatorer som aktivator protein 1 (AP-1) og nukleær faktor κ B (NF κ B). Som resultat av denne mekanismen vil transkripsjonen av inflammatoriske cytokiner som interleukiner (IL-2, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5), interferon- γ (IFN- γ), kjemokiner og

adhesjonsmolekyler bli nedsatt (15). Glukokortikoidene har i tillegg andre ikke-genetiske effekter. De påvirker blant annet lymfocyttenes bevegelse slik at de ikke kommer frem til sekundært lymfoid vev og andre steder med inflammasjon, men derimot samles opp i benmargen. Dette hindrer naive lymfocytter fra å bli stimulert av alloantigener og hindrer effektor-T-celler i å komme frem til, og angripe det transplanterte organet (2).

Glukokortikoidene er effektive som immundempende legemidler før transplantasjon. Når transplantasjonen finner sted vil allerede genekspresjonen av cytokiner være endret i mottakerens celler når de eksponeres ovenfor alloantigener ved transplantasjon. Glukokortikoidene (metylprednisolon) brukes i tillegg som akuttbehandling ved avstøtningsepisoder. Vanlige bivirkninger ved bruk av glukokortikoider er væskeretensjon, vektøkning, diabetes, nedsatt bentetthet og tynnere hud (2).

1.3.2 Kalsineurinhemmere

Oppdagelsen av CsA og takrolimus i henholdsvis 1977 og 1984 bidro til færre avstøtningsepisoder, høyere organoverlevelse etter transplantasjon og flere vellykkede transplantasjoner av andre typer organer og vev (2). CsA og takrolimus har ulik kjemisk struktur, men er begge hemmere av fosfatasen kalsineurin og fører til hemmet IL-2- avhengig T-celleaktivering på et tidlig stadium (overgang fra G_0 til G_1) i cellyklus. Aktiverte T-celler og signaler fra TCR fører vanligvis til hydrolyse av lipider i cellemembranen og frigjøring av kalsium fra intracellulære lagre. Kalsium aktiverer fosfatasen kalsineurin som videre fører til aktivering av transkripsjonsfaktoren nukleærfaktor for aktiverte T-celler (NFAT). Aktivert NFAT binder seg til transkripsjonsfaktor AP-1 i cellekjernen og regulerer transkripsjonen gener som koder for IL-2. CsA danner et kompleks med ciklofilin og takrolimus med FK506-bindende protein-12 (FKBP-12). Komplekset binder seg til kalsineurin, hemmer fosfataseaktiviteten og aktivering av NFAT. Som følge av at NFAT ikke aktiveres, hemmes dannelsen av cytokinene IL-2, IFN- γ og granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF). T-celleaktivering, proliferasjon og differensiering vil også bli hemmet. Aktiveringen av B-celler vil i tillegg bli dempet (2).

CsA og takrolimus absorberes forholdsvis raskt ved oral administrasjon. Maksimal blodkonsentrasjon (C_{max}) nås som regel innen 1-4 timer, men kan variere mellom pasienter. Biotilgjengeligheten for CNI er generelt lav (10 % - 30 %) og kan i stor grad forklares av

presystemisk metabolisme i tarmveggen og leveren på grunn av at CsA og takrolimus begge er substrater for P-glykoprotein (P-gp) og cytokrom P450 3A4 (CYP3A4) og CYP3A5 (16). CsA og takrolimus er i stor grad bundet til plasmaproteiner og røde blodceller. Legemidlene skilles hovedsakelig ut via galle og feces. Etter nyretransplantasjon er det terapeutiske området for CsA i fullblod 100-200 µg/L ved C₀ (rett før inntak av legemiddeldose 29-60 dager etter transplantasjon) og 3-7 µg/L (C₀ 1-180 dager etter transplantasjon) for takrolimus (17).

En fordel med CNI er at de ikke påvirker prolifererende celler. På denne måten unngår man redusert hematopoiese og intestinal skade som ved bruk av cytotoksiske legemidler. Ved bruk av CsA eller takrolimus over lang tid er nefrotoksisitet en bivirkning og kan være en årsak til at ikke alle pasienter tolererer legemiddelet over tid (2). De fleste bivirkningene er konsentrasjonsavhengige, og andre vanlige bivirkninger er svekket glukosemetabolisme, hypertensjon, gastrointestinal forstyrrelse, hyperkalemi og hypomagnesemi. Infeksjoner er relatert til over-immunsuppresjon (18).

1.3.3 mTOR-hemmere

Suksessen med CsA og takrolimus innenfor transplantasjon ga økt inspirasjon til å finne tilsvarende selektive legemidler. Sirolimus ble først oppdaget som et bakterielt produkt fra en jordprøve på Påskeøya. Senere ble strukturanalogen everolimus syntetisert. Sirolimus og everolimus blokkerer vekstfaktorinduserte signaler som medierer celledeling ved respons på alloantigener. Sirolimus og everolimus danner et kompleks med FKBP-12 på lik linje som takrolimus. I stedet for å hemme kalsineurin, blokkerer sirolimus og everolimus T-celleaktivering på et senere stadium i cellyklus ved å hindre signaloverføring fra IL-2 reseptoren ved å binde seg til og blokkere mTOR. mTOR er en nødvendig kinase i cellyklusprogresjonen. Inhibering av mTOR fører til nedsatt proteinsyntese og arrestasjon av cellene i et senere stadium (G₁-S) i cellyklus, sammenliknet med CNI. Både IL-2 reseptoravhengige signaleringsveier og signaleringsveier som er avhengig av *cluster of differentiation* 28 (CD28) blir inhibert ved blokkering av mTOR. Indirekte vil mTOR-hemmere blokkere effekten til CD4⁺ T-hjelpeceller, CD8⁺ cytotoksiske celler, samt aktiveringen av monocytter og proliferasjon og differensiering av B-celler (14,19)

Sirolimus og everolimus metaboliseres i stor grad i lever via CYP3A4 og skilles hovedsakelig ut via gallen i feces (20). C_{max} for sirolimus og everolimus nås 1-2 timer etter inntak. Det terapeutiske området i fullblod for sirolimus etter nyretransplantasjon er 10-15 µg/L (C_0 2-90 dager etter transplantasjon) og 3-6 µg/L for everolimus (C_0 7 uker etter transplantasjon) (17). Everolimus har kortere halveringstid enn sirolimus (21).

Bruk av mTOR-hemmere bør vurderes som en del av behandlingsregime etter nyretransplantasjon hvor pasienten har hatt malign sykdom før transplantasjon, eller utvikler det etter en tids bruk av immundempende legemidler (9). Flere kliniske studier har vist at sirolimus i kombinasjon med CsA har redusert tilfellene med akutt avstøtningsreaksjon, og i tillegg forlenget tiden det går fra transplantasjon til første avstøtningsepisode (19).

De fleste bivirkningene for sirolimus er konsentrasjonsavhengige og kan reduseres ved legemiddelkonsentrasjonsmålinger. Som for andre immundempende legemidler øker sirolimus risikoen for infeksjoner. Risikoen er avhengig av dose, samtidig bruk av andre immundempende legemidler og pasientfaktorer. Ellers er vanlige bivirkninger hyperlipidemi, trombocytopeni, leukopeni og anemi (19).

1.3.4 IMP-dehydrogenasehemmer

Cytotoksiske legemidler hemmer proliferasjonen av alloantigen-aktiverte lymfocytter, men kan også ødelegge andre celler og vev i kroppen som normalt er aktive i celledelingen. Eksempler på vev som påvirkes er benmargen, tarmepitel og hårfollikler. Et av de nyere cytotoksiske legemidlene er MPA (2). MPA foreligger enten som et prodrug (MPA mofetil) eller enterodrasjert (EC-MPA-natrium). Siden MPA ble introdusert på markedet har det blitt en av hjørnesteinene i behandlingen av transplanterte. Den immundempende effekten til begge formuleringene med MPA er basert på selektiv, reversibel, nonkompetitiv hemming av enzymet IMPDH. IMPDH er en nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+)-avhengig dehydrogenase og omdanner inosinmonofosfat (IMP) til xantosin monofosfat (XMP). IMPDH utgjør det hastighetsbestemmende trinnet i *de novo* syntesen (nysyntesen) av guanin-nukleotider, som kreves av lymfocytter for proliferasjon siden guanin-nukleotidene er essensielle i syntesen av ribonukleinsyre (RNA) og DNA. MPA blokkerer T- og B-lymfocyttenes overgang fra G_1 -S fasen i cellesyklus. MPA kan betraktes som en spesifikk hemmer av T- og B-lymfocytter, fordi T-lymfocytter og B-lymfocytter i stor grad er avhengig

av *de novo* (nysyntesen) av puriner for proliferasjon, mens andre celletyper også kan benytte seg av andre veier (14,22). MMF i kombinasjon med en CNI og steroider har vist seg å redusere forekomsten av akutte avstøtningsepsioder (23-25). Doseringen av MPA tilpasses i forhold til hvilken CNI som legemidlet kombineres med (9). Dersom man tillater redusert dose av CsA, kan MPA stabilisere eller forbedre organfunksjon etter nyretransplantasjon i pasienter med CsA-relatert nefrotoksisitet (26).

Biotilgjengeligheten etter oral administrasjon ligger rundt 80-95 % for MMF og 70 % for EC-MPA-natrium. MPA bindes i stor grad til plasma-albumin, metaboliseres hovedsakelig i lever og skilles ut via urinen. MPA bindes ikke til blodceller i lik grad som CNI, og terapeutisk legemiddelmonitorering for MPA utføres i plasmaprøver. Maksimum konsentrasjon for MPA (fra MMF) nås etter 1-2 timer og etter ca. 4 timer for EC-MPA-natrium (27).

MPA er generelt sett et godt tolerert immundempende legemiddel. De vanligste bivirkningene ved bruk av legemiddelet er kvalme, oppkast og diaré. Disse bivirkningene er mest uttalt hos pasienter som bruker høye doser og kan reverseres ved dosereduksjon. Andre gastrointestinale bivirkninger som blødende gastritt, perforert tykktarm og pankreatitt er rapportert i svært sjeldne tilfeller. Benmargssuppresjon er sett etter langtidsbruk av MPA og inkluderer leukopeni, trombocytopeni og anemi (26).

1.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering

Mange av de immundempende legemidlene, deriblant CsA, takrolimus, sirolimus, everolimus og MPA, er karakterisert med smale terapeutiske konsentrasjonsområder og store interindividuelle og intraindividuelle variasjoner med hensyn til både farmakokinetikk og farmakodynamikk (25). Smale terapeutiske konsentrasjonsområder gjør at veien blir kort fra optimal dosering til underdosering med manglende immundempende effekt og økt fare for avstøtning, og til overdosering med påfølgende bivirkninger.

Terapeutisk legemiddelmonitorering (*therapeutic drug monitoring*; TDM) innebærer at legemiddeldosen tilpasses hver enkelt pasient på bakgrunn av konsentrasjonsmålinger av legemiddelet i blod, serum eller plasma. Legemidler som er aktuelle for TDM har smale terapeutiske konsentrasjonsområder og store intraindividuelle og interindividuelle forskjeller,

samt at terapivikt eller bivirkninger er alvorlige for pasienten. Etter innføringen av TDM for immundempende legemidler i transplantasjonssammenheng, har forekomsten av avstøtningsepisoder blitt redusert og legemiddelspesifikk toksisitet i tillegg til infeksjoner som følge av overdosering blitt begrenset. Legemiddelkonsentrasjonsmålinger er allerede etablert rutine i klinisk praksis og betegnes som farmakokinetisk legemiddelmonitorering. Farmakodynamisk monitorering kan betraktes som en ny strategi innenfor TDM for å overgå begrensninger ved farmakokinetisk monitorering. Interaksjoner mellom legemidler ved kombinasjonsbehandling er eksempel på en situasjon som begrenser bruk av farmakokinetisk monitorering (13,28).

1.4.1 Farmakokinetisk monitorering

Farmakokinetikk beskriver forholdet mellom legemiddelkonsentrasjon som foreligger ulike steder i kroppen i løpet av og etter dosering. Farmakokinetikk sier noe om hva kroppen gjør med legemidlet. Fire prosesser står sentralt i farmakokinetikken: absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon (29).

Farmakokinetisk legemiddelmonitorering er en del av TDM og blir rutinemessig brukt for å måle konsentrasjonen av immundempende legemidler i blod eller plasma for å tilpasse doseringen til legemidlets terapeutiske område. På denne måten reduserer man risikoen for avstøtning og toksiske bivirkninger.

Legemiddelkonsentrasjon ved C_0 blir rutinemessig brukt for å individualisere dosen av de fleste immundempende legemidler. I de tilfellene hvor C_0 ikke har vist seg å være den mest hensiktsmessige markøren på total legemiddeleksponering, har legemiddelkonsentrasjonen blitt målt ved andre tidspunkter, spesielt i absorpsjonsfasen. For noen legemidler kan det være fordelaktig å måle legemiddelkonsentrasjon to timer etter legemiddelinntak (C_2) og ikke ved predose (30).

Monitorering av C_0 er mest utbredt for CsA, selv om det er kjent at C_0 ikke reflekterer arealet under konsentrasjon-tidskurven fra 0 til 12 timer etter dose (AUC_{0-12t}) nøyaktig. AUC regnes som det beste uttrykket for legemiddeleksponering. Ved nyretransplantasjon har arealet under konsentrasjon-tidskurven fra 0 til 4 timer etter dose (AUC_{0-4t}) vist seg å korrelere bedre med AUC_{0-12} for CsA. Måling av C_2 har vist seg å fungere som en passende markør for

legemiddeleksponering av CsA. Flere undersøkelser av nyretransplanterte pasienter har vist at monitorering av C_2 kan være nyttig verktøy for å oppdage overeksponering av CsA. Resultater fra studier har vist at en kombinasjon av C_0 og C_2 -monitorering er anbefalt for CsA. C_0 -nivået kan være en bedre indikator på compliance, fordi nivået ved C_2 som tas i løpet av et sykehusbesøk ikke varsler legen hvorvidt pasienten tar medisinen sin regelmessig eller ikke. For takrolimus har monitorering av C_0 vist god korrelasjon med AUC_{0-12t} (30).

Det vanligste er å basere TDM på enkeltmålinger som blir tatt rett før inntak av legemiddeldose. For MPA har det vist seg å være vanskelig og finne sterk korrelasjon mellom plasmakonsentrasjon og terapeutisk effekt, og det er ikke vist noen tydelig sammenheng mellom plasmakonsentrasjon og bivirkninger. Det er likevel vanlig å måle plasmakonsentrasjonen like før dose relativt hyppig, og vurdere den ut ifra det totale kliniske bildet. Man oppnår bedre korrelasjon til klinisk effekt ved å måle AUC_{0-12t} eller ved å estimere AUC_{0-12t} ved hjelp av to til tre enkeltmålinger i begynnelsen av doseintervallet (17).

For mTOR-hemmerene sirolimus og everolimus er det vist god korrelasjon mellom C_0 og AUC_{0-12t} . C_0 -monitorering blir av den grunn brukt som markør på legemiddeleksponering for sirolimus og everolimus (30).

1.4.2 Farmakodynamisk monitorering

Farmakodynamikk er relatert til legemidlenes virkningsmekanismer med hensyn til interaksjonen mellom legemiddel og reseptor, og sier noe om hva legemiddelet gjør med kroppen (29).

For å evaluere det terapeutiske potensialet til immundepende legemidler hos en pasient før transplantasjon, kan farmakodynamiske målinger *ex vivo* ved bruk av mononukleære celler i perifert blod (PBMC) eller mer spesifikke populasjoner av immunceller være en hensiktsmessig strategi. Bruk av PBMC *ex vivo* kan tenkes å bidra til og predikere hvor sensitiv en pasient er overfor immundepende legemidler (31). Kurata et al. har foreslått at man kan predikere en pasients sensitivitet overfor immundepende legemidler ved hjelp av dose-responskurver med proliferasjonen av PBMC som mål på respons (32).

Måling av molekylær eller cellulær farmakodynamisk respons i tillegg til legemiddelkonsentrasjoner kan være nyttig for å predikere farmakodynamiske effekter hos hver enkelt pasient og bidra til individualisert legemiddelbehandling. Farmakodynamisk legemiddelmonitorering blir ikke brukt i klinisk praksis i transplantasjonsmedisinen, men er en viktig del av forskningen innenfor TDM og inkluderes i mange kliniske studier. Cellulære studier har vist at farmakodynamisk monitorering kan bidra til økt sikkerhet og effekt ved immundempende legemiddelbehandling etter nyretransplantasjon (14,33,34).

1.5 Biomarkører

Et virkningsfullt behandlingsregime med minimale toksiske virkninger er et av de store behandlingsmålene med immundempende legemidler etter transplantasjon. En av strategiene for å forhindre avstøtningsreaksjoner på et tidlig tidspunkt og skape god vedlikeholdsbehandling, er å kombinere synergistiske legemidler. Farmakodynamisk legemiddelmonitorering anses som et potensielt nyttig verktøy for å vurdere virkningen av ulike legemiddelkombinasjoner, samt komme frem til optimale doseringsregimer. Derfor er det nødvendig med kunnskap om ulike farmakodynamiske prosesser. Forskning på immundempende legemidlers virkningsmekanismer har resultert i flere farmakodynamiske biomarkører (33). En molekylær farmakodynamisk biomarkør korrelerer med et legemidlets effekt eller toksisitet. Gener (DNA, RNA), proteiner, andre organiske molekyler og metabolitter er eksempler på farmakodynamiske biomarkører. Mengden eller aktiviteten til de nevnte molekyler fungerer som biomarkører.

Noen farmakodynamiske biomarkører klassifiseres som legemiddelspesifikke. Legemiddelspesifikke biomarkører kan relateres til legemidlets virkningsmekanisme, og et viktig eksempel innenfor transplantasjon og immundempende legemidler er IMPDH for MPA. Andre farmakodynamiske biomarkører kan sees på som mer generelle i den cellulære immunresponsen. En generell farmakodynamisk biomarkør reflekterer summen av all immunsuppresjon som resultat av kombinasjonsbehandling med immundempende legemidler. T-celleproliferasjon er et eksempel på en generell biomarkør (33).

Flere generelle og legemiddelspesifikke farmakodynamiske biomarkører relatert til immunsuppresjon har blitt undersøkt og er under utprøving som potensielle kandidater i

klinisk praksis. Det hevdes at en kombinasjon av biomarkører vil være det mest ideelle for å kunne individualisere den immundempende behandlingen etter en transplantasjon (14).

1.5.1 Metabolsk aktivitet

Cellers metabolske aktivitet gjenspeiler proliferasjon og levedyktighet, og kan brukes som mål på immuncellers aktiveringsgrad. Metabolsk aktivitet som biomarkør på T-celleproliferasjon, kan betraktes som generell i den cellulære immunresponsen. Når en kombinasjon av immundempende legemidler brukes for å hindre avstøtningsreaksjoner etter en transplantasjon, vil den metabolske aktiviteten reflektere den totale immunsuppresjonen uten å ta hensyn til hvert enkelt legemiddel og tilhørende virkningsmekanisme (32). Kvantifisering av metabolsk aktivitet kan være nyttig ved uttesting av ulike prinsipper for *ex vivo* immunaktivering. Biomarkørens respons på immundempende legemidler kan undersøkes ved å eksponere aktiverte celler med immundempende legemidler for deretter å kvantifisere metabolsk aktivitet og lage legemiddelresponskurver.

Metabolsk aktivitet kan kvantifiseres ved tilsetning av et tetrazoliumsalt direkte til brønner med cellesuspensjon. Eksempler på tetrazoliumsalter er MTT, XTT og *water soluble tetrazolium salt 1* (WST-1). Celleproliferasjonsreagenset WST-1 vil i nærvær av metabolsk aktive celler bli redusert til et farget endeprodukt, formazan. Et av fortrinnene til WST-1 er at endeproduktet er vannløselig, og det kan da måles direkte i cellesuspensjonen. Mekanismen bak reduksjonen er ikke fullstendig klarlagt, men det er observert at WST-1 som inneholder en elektronakseptor, blir redusert av superoksid fra prolifererende celler via nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-oksidase. I et inhibisjonsforsøk ble det vist at 98 % av WST-1-reduksjonen ble inhibert av superoksiddismutase og 88 % av NADPH-oksidase inhibitor. WST-1 assay er tidligere blitt brukt for å undersøke neutrofil dysfunksjon og for å sammenlikne anti-inflammatorisk aktivitet (35). Den totale aktiviteten til mitokondrielle dehydrogenaser, deriblant NADPH-oksidase, øker i takt med antall prolifererende og levedyktige celler i en cellepopulasjon. Mengde formazan som dannes, gjenspeiler enzymaktiviteten, og korrelerer direkte med den totale metabolske aktiviteten. Formazan absorberer lys ved 450 nm og absorbansen kan måles ved hjelp av et spektrofotometer.

Sensitiviteten er høy og bakgrunnsabsorbansen lav ved bruk av WST-1 i celleproliferasjonsforsøk. Det dannes stabile formazan-endeprodukter og absorbansen ved 450

nm kan eventuelt leses av kontinuerlig og det kan da produseres resultater i løpet av kort tid. Sammenliknet med ferricytochrome som er et førstegenerasjons celleproliferasjonsreagens, er bruk av WST-1 mer prisgunstig (35).

1.5.2 IMPDH-aktivitet

Enzymet IMPDH katalyserer oksideringen av IMP til XMP. Dette er det hastighetsbestemmende trinnet i nysyntese av guanin og deoksyguanin nukleotider. Det er observert 10 ganger økt IMPDH-aktivitet i aktiverte T-lymfocytter. IMPDH foreligger som to isoformer, type I og type II. De to enzymene har 84 % identiske aminosyresekvenser og har praktisk talt samme kinetiske egenskaper. Den økte IMPDH-aktiviteten under immunaktivering skyldes oppregulering av begge enzymene (36). Biosyntesen av guanin er nødvendig for både T – og B-lymfocytters proliferasjon.

IMPDH-aktivitet betraktes som en spesifikk farmakodynamisk markør for MPAs molekulære effekt, og enzymaktiviteten kan måles ved væskechromatografisk analyse av produktet i enzymreaksjonen (2,37-39). Per i dag er det lite data tilgjengelig på forholdet mellom farmakokinetikk og farmakodynamikk hos pasienter som behandles med MPA.

I en studie hvor IMPDH-aktiviteten ble målt i ustimulerte PBMC fra pasienter før nyretransplantasjon, ble det observert opptil 10 ganger forskjell i IMPDH-aktivitet mellom pasientene. Det ble imidlertid sett små intra-individuelle forskjeller. Det antydes at kliniske forskjeller i effekt og bivirkninger, som er observert hos pasienter som behandles med MPA, kan forklares av de store interindividuelle variasjonene. Det ble observert at flere avstøtningsreaksjoner forekom hos pasienter hvor det ble målt høy IMPDH-aktivitet før transplantasjon. Genetiske forskjeller kan være en av forklaringene til de store variasjonene (14). Det er vist at forholdet mellom MPA og IMPDH-aktivitet i ikke-aktiverte lymfocytter er invers korrelert (40). Kvantifisering av IMPDH-aktivitet kan være et nyttig verktøy for å optimalisere og individualisere legemiddelbehandlingen med MPA etter en transplantasjon. Samtidig kan det bidra til å frembringe ny kunnskap om legemiddelets virkningsmekanisme. Studier av IMPDH-aktivitet hos transplanterte har så langt vært utført i ikke-aktiverte lymfocytter (14). Et nytt prinsipp vil være å aktivere isolerte lymfocytter *ex vivo* og deretter måle IMPDH-aktivitet. Da kan man sannsynligvis kunne observere effekten av MPA i en fremprovosert immunreaksjon som etterlikner en immunologisk avstøtningsepisode.

1.5.3 Cytokiner

Cytokiner er proteiner som skilles ut fra en celle og påvirker samme celle samt andre cellers funksjoner. Cytokinene utøver sin effekt ved å binde seg til spesifikke cytokinreseptorer på celleoverflaten. Spesifikke antigener som presenteres for naive T-celler av antigen-presenterende celler, igangsetter en kaskade som fører til celledeling, celledifferensiering og ervervelse av T-cellenes effektorfunksjoner. Cytokiner er med på å kontrollere et slikt celledifferensieringsprogram som fører til aktiverte effektor-T-celler (2). Cytokinenes regulering av immunsystemet spiller en viktig rolle i kroppens forsvar og eliminasjon av infeksjøse agens som bakterier, virus, sopp og parasitter. Oppregulering av spesifikke cytokiner, særlig IL-2, fører til økt T-celleproliferasjon, som er et nøkkeltrinn i avstøtningsreaksjoner etter organtransplantasjon (14). Høye cytokinnivåer er i tillegg forbundet med noen kreftformer, akutte og kroniske inflammasjonssykdommer, samt autoimmune sykdommer (41).

Cytokinene kan grupperes på bakgrunn av hvilke celler de skilles ut ifra og funksjonene de har i immunsystemet. Interleukiner og interferoner skilles i hovedsak ut fra leukocyter. IL-2 syntetiseres og skilles ut fra aktiverte T-celler. IL-2 bindes til IL-2-reseptorer på T-cellenes overflate. Signalering via IL-2 er nødvendig for proliferasjonen av aktiverte T-celler og utvikling av den adaptive immunresponsen. Virkningsmekanismene til de immundepende legemidlene CsA, takrolimus, sirolimus og everolimus, som brukes for å forhindre avstøtningsreaksjoner etter transplantasjon, er relatert til IL-2-signaleringsen. CsA og takrolimus inhiberer produksjonen av IL-2 ved å hemme signaleringen fra TCR, mens sirolimus og everolimus hemmer signaleringen fra IL-2-reseptoren (2).

IL-6 og tumor nekrose faktor- α (TNF- α) skilles ut fra makrofager og T-celler, og induserer en rekke inflammatoriske responser på et tidlig stadium ved infeksjon. IFN- γ er et produkt av både CD4+ hjelperceller, CD8+ T-celler og *natural killer cells* (NK-celler), men produseres i hovedsak av NK-celler. IFN- γ aktiverer makrofager som resulterer i ytterligere utskillelse av cytokiner som bidrar til T-celleaktivering og initierer den adaptive immunresponsen (2).

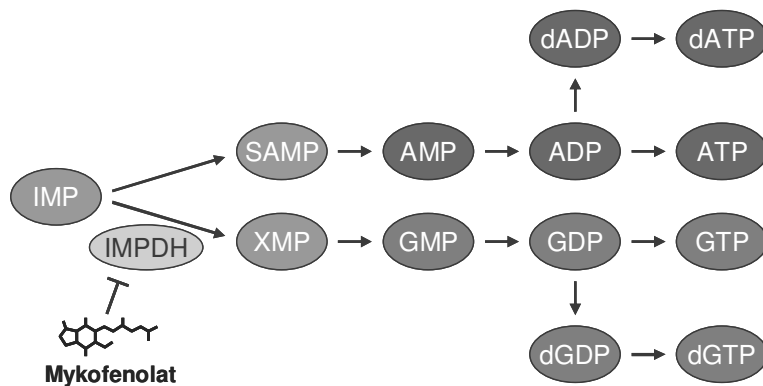
GM-CSF er et cytokin som stimulerer utviklingen av hvite blodceller fra hematopoietiske stamceller og skilles ut fra T-celler. GM-CSF blir gitt til benmargstransplanterte pasienter for å stimulere rekonstruksjonen av deres immunsystem (2).

Kvantifisering av cytokinnivåer har vist seg å gi nyttig informasjon om de patologiske prosessene for flere forskjellige sykdommer, deriblant Crohns sykdom og reumatoid artritt (42). På bakgrunn av at cytokinene står sentralt i reguleringen av immunsystemet og er involvert i avstøtningsreaksjoner etter transplantasjon, kan kvantifisering av cytokinproduksjon – og utskillelse være nyttig i transplantasjonssammenheng for å undersøke hvordan nivåene påvirkes ved *ex vivo* immunaktivering og i nærvær av immundempende legemidler. Flere immundempende legemidler påvirker cytokinutskillelsen og kvantifisering av cytokiner kan bidra til å fremlegge ny kunnskap om de ulike virkningsmekanismene. Sullivan et al målte produksjonen av cytokinene IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ og TNF- α i isolerte PBMC, stimulert med phytohemagglutinin (PHA) og phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) i ulike kombinasjoner. Tre ulike deteksjonsprinsipper ble testet ut: RNA-analyse, analyse av utskilte cytokiner og analyse av intracellulære cytokiner. For de fem cytokinene i stimulerter celler ble det observert 22-75 ganger økte nivåer, sammenliknet med ustimulerter celler (42). Produksjon av cytokinene IL-1, IL-2, IL-10, IFN- γ og TNF- α i både fullblod og PBMC stimulert med lipopolysakkarid og concanavalin A (conA) er tidligere utført av Parveen et al. Studien ble utført i prøver fra friske frivillige, og indikerte at det er stor interindividuell variasjon i *ex vivo*-stimulert cytokinproduksjon.

1.5.4 Purinbaser

Purinnukleotider inngår som byggesteiner i RNA og DNA, og alle celler som skal vokse og dele seg er avhengig av nysyntese av purinnukleotidene, inkludert T- og B-lymfocytter (figur 3). I nysyntesen av purinnukleotider blir fosforibosylpyrofosfat (PRPP) omdannet via flere enzymkatalyserte trinn til IMP som er forløperen til både adenin- og guanin-nukleotidene. Enzymet IMPDH omdanner IMP til XMP som videre omdannes til guanosin-mono/di/tri-fosfat (GMP, GDP, GTP) og deoksyguanosin-/di/tri-fosfat (dGDP, dGTP). Tilsvarende nukleotider av adenin dannes fra IMP via succinyl-adenosinmonofosfat (36).

Lymfocytter som responderer på mitogen-stimulering, opprettholder en økt konsentrasjonen av PRPP. Økt PRPP er assosiert med økt IMPDH-aktivitet og reguleres av tilgjengeligheten på purinnukleotider. Prolifererende celler vil øke andelen guanin-nukleotider for syntese av RNA og DNA (36).



Figur 3. *De novo* biosyntesen av purinnukleotider og mykofenolat (MPA)-mediert hemming av inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH). IMPDH omdanner inosinmonofosfat (IMP) til xantosinmonofosfat (XMP), som videre omdannes til guanosin-mono/di/tri-fosfat og deoksyguanosin-/di/tri-fosfat (GMP, GDP, GTP, dGDP og dGTP). Tilsvarende nukleotider av adenin dannes fra IMP via succinyl-adenosinmonofosfat (SAMP). Fosforibosylpyrofosfat (PRPP).

I tillegg til IMPDH-aktivitet, har purinnukleotidene blitt undersøkt som spesifikke biomarkører for MPA. Vethe *et al.* målte nivå av GDP, GTP, adenosin monofosfat (AMP), adenosin difosfat (ADP) og adenosin trifosfat (ATP) i CD4⁺ celler isolert fra friske frivillige personer etter inntak av fire forskjellige doser med MPA. GDP, ADP og AMP så ut til å holde seg på et stabilt nivå, mens nivåene av GTP og ATP så ut til å øke etter inntak av MPA (43). I følge teorien skyldes den immundempende effekten til MPA reduserte nivåer av (deoksy) guaninnukleotider, og ikke økte nivåer av GTP og ATP som vises i resultatene fra studien. Så langt er det begrenset data på hvordan repetert dosering av MPA hos transplanterte vil påvirke nivåene av purinnukleotider, og hvorvidt disse kan være egnet som biomarkører. Det kan tenkes at også andre legemidler påvirker nivåene av purinnukleotider.

1.6 Prinsipper for ex vivo immunaktivering

Ved aktivering av T-celler, interagerer T-cellen med en APC (dendritiske celler, makrofager, B-celler). Det dannes en immunologisk synapse som består av TCR, peptid:HLA-kompleks, adhesjonsmolekyler, koreseptorer (CD3) og kostimulatoriske molekyler (CD28). For at T-cellen skal aktiveres, må TCR gjenkjenne peptidet som presenteres på HLA-molekylet. T-cellen er avhengig av en kombinasjon av signaler for å aktiveres. Den intracellulære signaleringen som settes i gang når TCR interagerer med peptid:HLA kompleks er nødvendig for å aktivere T-cellen, men ikke tilstrekkelig. I tillegg kreves kostimulering for at T-cellen skal aktiveres, proliferere og differensiere. Kostimulatoriske molekyler uttrykkes på overflaten til APC. På overflaten til naive T-celler sitter overflateproteinet CD28 som mottar kostimulatoriske signaler slik at T-cellen blir aktivert. Liganden for CD28 er B7 (B7.1 og B7.2). Når B7 på APC binder seg til CD28 på T-cellen vil det resultere i et intracellulært signal som sammen med andre signalveier setter i gang gentranskripsjon og translasjon av gener som er viktige for T-celleaktiveringen, deriblant transkripsjonsfaktorene NFAT, NF- κ B og AP-1. Sammen vil effekten av disse transkripsjonsfaktorene skru på transkripsjonen av gener som er direkte relatert til T-celleproliferasjon og utviklingen av effektorfunksjoner. En av de viktigste mediatorene i denne sammenhengen er cytokinet IL-2. CD4⁺ celler lager både IL-2 og reseptoren til IL-2, mens CD8⁺ celler lager lite IL-2 og er avhengig av en samtidig CD4⁺-cellerespons. CD4⁺ celler fungerer derfor som en hjelpercelle for CD8⁺ celler. IL-2 binder seg til IL-2-reseptoren på T-celleoverflaten og driver klonal ekspansjon av den aktiverte T-cellen (2,8).

Stimulering av T-celler gjennom TCR-komplekset igangsetter en kaskade med signaler som blant annet fører til økt konsentrasjon av intracellulært kalsium, samt aktivering av diacylglycerol (DAG) – og kalsiumavhengig protein kinase C (PKC) (44). Ved *ex vivo* immunaktivering kan de antigen-og reseptormediatede trinnene etterlignes eller forbigås ved stimulering med mitogenene PHA, PMA og ionomycin i ulike kombinasjoner eller ved aktivering med antistoffer mot CD3 (en del av TCR) og CD28 (kostimulatorisk reseptor).

1.6.1 Phytohemagglutinin

Lektinet PHA-L er et glykoprotein som agglutinerer leukocytter og fungerer som et mitogen. PHA-L har høy affinitet til overflatereseptorer på lymfocytter, og er mye brukt som selektiv aktivator for T-lymfocytter og som verktøy for å studere mekanismen bak antigenstimulering og cellevekst (45). Ved *ex vivo* aktivering av humane T-celler, vil PHA-L interagere og binde seg direkte til TCR. PHA-L er et multivalent lektin og binder til flere T-celler samtidig slik at de kryssbindes. Interaksjonen mellom PHA-L og TCR-komplekset trigger den intracellulære signalveien med produksjon av IL-2 og aktivering av naive T-celler som resultat (46).

1.6.2 Phorbol 12-myristat 13-acetat

PKC utgjør et sentralt ledd i den intracellulære signaleringen som fører til T-celleaktivering. PKC er avhengig av kalsium og økte konsentrasjoner av DAG for å aktiveres. PMA har strukturelle likheter med DAG og fungerer som en potent aktivator av PKC. PMA stimulerer via denne mekanismen produksjon av IL-2 og aktiverer naive T-celler (47).

1.6.3 Ionomycin

Aktivering og proliferasjon av T-celler er avhengig av økte intracellulære nivåer av kalsium, som blant annet bidrar til aktivering av PKC. Ionomycin er en antibiotisk ionofor som binder og transporterer kalsium over cellemembraner. Ionomycins effekt på kalsiuminfluxen i cellene fasiliterer den videre intracellulære signaleringen som fører til aktivering av T-celler, deriblant aktivering av PKC (48). Studier har vist at ionomycin og PMA i kombinasjon induserer produksjonen av IL-2, som ved binding til IL-2 reseptorene setter i gang flere signalveier som til slutt resulterer i lymfocyttaktivering (49).

1.6.4 Stimulering via CD3/CD28

CD4⁺ celler isoleres ved hjelp av magnetkuler dekket med antistoffer mot CD4. Cellene aktiveres ved hjelp av antistoffer som binder seg til CD3 og CD28. Produktet som brukes for isolering og aktivering av CD4⁺celler består av magnetiske kuler av lik størrelse som er dekket med monoklonale antistoffer rettet mot CD3 og CD28. Aktiveringsprinsippet etterlikner *in vivo* celleaktivering via APC ved at signaler via TCR (CD3) og kostimulatorisk reseptor (CD28) til sammen vil aktivere de CD4⁺ cellene.

2 HENSIKT

Transplanterte pasienter bruker kombinasjoner av immundempende legemidler for å hindre avstøtningsepsioder. På grunn av store farmakokinetiske forskjeller mellom pasienter, styres den immundempende behandlingen vanligvis ved å måle legemiddelnivå i blod eller plasma. Det er i tillegg vist betydelige variasjoner i legemidlenes molekylære respons. Det er mulig at farmakodynamiske biomarkører i tillegg til legemiddelkonsentrasjoner kan være nyttig for å predikere kliniske effekter av immundempende legemidler og brukes til å individualisere legemiddelbehandlingen hos transplanterte.

Formålet med dette delprosjektet var å utvikle metoder som kan brukes til kvantifisering av generelle og legemiddelspesifikke biomarkører i *ex vivo* aktiverte immunceller. Ulike *ex vivo* aktiveringsprinsipper skulle testes ut. Metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser skulle undersøkes som potensielle biomarkører i PBMC. Det skulle utvikles en metode for å måle cytokinutskillelse i ulikt cellemateriale fra blodprøver. Videre skulle det undersøkes om metodene egnet seg til å måle de immundempende legemidlenes effekter på biomarkørene. Etablerte metoder skulle benyttes til å kvantifisere de ulike biomarkørene i blodprøver fra nyretransplanterte pasienter som ble inkludert i en pilotstudie som på forhånd var godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Hensikten med studien var å undersøke hvordan biomarkørene egnet seg til å predikere klinisk immundempende effekt hos nyretransplanterte.

Det overordnede formålet var å frembringe ny kunnskap om de immundempende legemidlenes virkningsmekanisme, samt å identifisere potensielle biomarkører som kan predikere kliniske effekter av immundempende legemidler hos transplanterte pasienter.

3 MATERIALER

3.1 Utstyr

Beskrivelse	Navn	Produsent
Bio-Plex instrument	Bio-Plex	Bio-Rad, Hercules, CA
Brett 96 brønner (klart)	96 well plates, Nunc	Thermo Scientific, Roskilde, Danmark
Celledyrkningsrør	Falcon-rør, 5 mL Polystyrene Round- bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA
Celleteller	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter Brea, CA
Inkubatorskap	Thermo Scientific Forma, Steri cycle, CO ₂ incubator	Thermo Scientific, Tyskland
Kjølesentrifuge (4 °C) til sentrifugerør	Kubota 5930 Universal Refrigerated Centrifuge	Kubota Corporation Tokyo, Japan
Kolonner LC-MS/MS	Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 × 150 mm Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 × 10 mm	Waters, Manchester, UK
LC-MS/MS	Waters 2795 Separations Module Waters Quattro micro API	Waters, Manchester, UK

Leucosep-rør	Leucosep-Tube, 12 mL	Greiner Bio-One GmbH, Tyskland
Na-Heparin-rør	Sodium Heparin Tubes	BD Vacutainer Systems Plymouth, UK
Magnet	Dynal MPC-S / MPS-L	Invitrogen, Carlsbad, CA
Mikrosentrifugerør	Sarstedt Tube 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
Pipettespisser	Art® Aerosol resistant tips	Molecular BioProducts, Thermo Fischer Scientific, Tyskland
Plateleser	Wallac 1420 Victor ² Multilabel Counter	PerkinElmer, Waltham, MA
Platerister	Wallac 1296-001 Delfia plateshake	PerkinElmer, Waltham, MA
Polypropylenrør 1,5 mL med lav proteinbinding	Protein LoBind Tube, 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Programvare Bio-Plex	Bio-Plex Manager TM	Bio-Rad, Hercules, CA
Programvare LC-MS/MS	MassLynx	Waters, Manchester, UK
Programvare, nonlineær regresjon	GraFit, versjon 5	Erithacus Software, Surrey, UK
Reagensrør (hvite)	Vacurette, 4 mL	BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK

Rulle med tilting	Boule Mixer 820	Boule Diagnostics Int, Stockholm, Sverige
Sentrifuge (romtemperatur)	Megafuge 1.0	Heraeus instruments Hanau, Tyskland
Sentrifugerør	Falcon-rør, 14 mL Polystyrene Round- bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Sentrifuge til mikrosentrifugerør (4 °C)	Jouan BR4i	Thermo Scientific, ON, Canada
Mikrofiltreringsrør	Ultrafree-CL Centrifugal Filter Units (0,1 mm)	Millipore, Billerica, MA
Vannbad	Grant ristevannbad Modell OLS 200	Grant, Cambridge, Storbritannia
Varmeblokk	Techna Dri-Block, DB-3D	Techna, Cambridge, UK
Vortexmixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries INC, Bohemia, NY
Ultralydbad	Branson 1210	Branson, Danbury, CT

3.2 Reagenser

Beskrivelse	Navn	Produsent
Acetonitril (ACN)	Acetonitrile, HPLC grade	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
Adenosinmonofosfat (AMP)	Adenosine 5'-monophosphate disodium	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Aktiveringskuler for CD4 ⁺ celler	Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen, Carlsbad, CA
Ammoniumacetat	Ammonium acetate, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Bio-Plex TM Cytokine Assay	Bio-Plex TM Cytokine Assay	Bio-Rad, Hercules, CA
BSA	Albumin solution from bovin serum, 30 %	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
¹³ C ₅ -adenine	Adenine (¹³ C ₅)	Larodan Fine Chem, Malmö, Sverige
¹³ C, ¹⁵ N ₂ -guanine	Guanine (8- ¹³ C; 7,9- ¹⁵ N ₂)	Camebridge Isotope Lab, Andover, MA
Ciklosporin A	Cyclosporin A	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada

D ₂ -hypoxantin	Hypoxantin (D ₂)	Camebridge Isotope Lab, Andover, MA
Ditiotreitol (DTT)	DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, anhydrous	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Everolimus	Everolimus	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada
Fosfatbufret saltvann (PBS)	PBS, BioWhittaker	Lonza, Verviers, Belgia
Frakoblingsreagens for CD4 ⁺ celler	DEATACHaBEAD CD4	Invitrogen, Carlsbad, CA
Guanosinmonofosfat (GMP)	Guanosine 5'-monophosphate disodium	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Inosinmonofosfat (IMP)	Inosine 5'-monophosphate	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Ionomycin	Ionomycin calcium salt from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Isoleringskuler for CD4 ⁺ celler	Dynal CD4 Positive Isolation Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA

Isoton væske til celletelling	Coulter Isoton Diluent	Beckman Coulter, Brea, CA
Kaliumacetat (KAc)	Potassium acetate	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Kaliumklorid (KCl)	Potassium chlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Kalveserum (FCS)	Newborn Calf Serum, from bovine calves	Sigma Aldrich, St. Louis MO
Maursyre	Formic acid, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Metanol (CH ₃ OH)	Methanol	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
Mykofenolat	Mycophenolic acid	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada
¹⁵ N ₂ -xanthin	Xanthine (1,3- ¹⁵ N ₂)	Larodan Fine Chem, Malmø, Sverige
Nikotinamid- adenindinukleotid (NAD)	β-Nicotineamide adenine dinucleotide hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Penicillin-Streptomycin	Pen-Strep 10 000 U Penicillin/mL 10 000 U Streptomycin/mL	Lonza, Verviers, Belgia
Perklorsyre (HClO ₄)	Perchloric acid 70 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

PHA-L	Phytohemagglutinin-L	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Prednisolon	Prednisolone	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
RPMI 1640	RPMI 1640 Medium with L-Glutamin and NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Sirolimus	Rapamycin	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada
Takrolimus	FK-506 monohydrat	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Tris-hydroklorid (Tris-HCl)	Trizma buffer substance	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Vann	Filtrert, ionebyttet vann fra Milli-Q vann- rensesystem	Millipore, Billerica, MA
WST-1 (Celleproliferasjons- reagens)	Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostic, Mannheim, Tyskland
Xantosin	Xanthosine (x2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Kalibratorer:

	Xantosin ($\mu\text{mol/L}$)	IMP ($\mu\text{mol/L}$)	GMP ($\mu\text{mol/L}$)	AMP ($\mu\text{mol/L}$)
Blank	0	0	0	0
Kalibrator 1	0,50	0,50	1,00	2,50
Kalibrator 2	2,50	1,00	5,00	12,5
Kalibrator 3	10,0	10,0	20,0	50,0
Kalibrator 4	50,0	40,0	100	250
Kalibrator 5	100	80	200	500

Kontroller:

	Xantosin ($\mu\text{mol/L}$)	IMP ($\mu\text{mol/L}$)	GMP ($\mu\text{mol/L}$)	AMP ($\mu\text{mol/L}$)
Kontroll lav	0,50	0,50	1,00	2,50
Kontroll middels	10,0	10,0	20,0	50,0
Kontroll høy	100	80	200	500

Medium A:

RPMI 1640 med L-glutamin og NaHCO_3 , tilsatt 125 U/mL Penicillin-Streptomycin

Medium B:

RPMI 1640, tilsatt 0,5 % BSA

Medium C:

RPMI 1640 med L-glutamin og NaHCO_3 , tilsatt 200 U/mL Penicillin-Streptomycin og 0,72 % DMSO

Buffer 1:

PBS u/ Ca^{2+} og Mg^{2+} , tilsatt 0,1 % BSA og 2 mmol/L EDTA

Buffer 2:

RPMI 1640, tilsatt 1 % FCS

Assay-buffer:

Tris-hydroklorid 250 mmol/L, EDTA 7,50 mmol/L, KCl 250 mmol/L og DTT 5,00 mmol/L

Substrat/kofaktorløsning:

IMP 1,80 mmol/L og NAD 0,40 mmol/L

Internstandardløsning:

$^{15}\text{N}_2$ -xanthin (25 $\mu\text{mol/L}$), D_2 -hypoxantin (25 $\mu\text{mol/L}$), ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$ -guanine (25 $\mu\text{mol/L}$) og $^{13}\text{C}_5$ -adenine (25 $\mu\text{mol/L}$)

Kaliumacetat:

4,0 mol/L

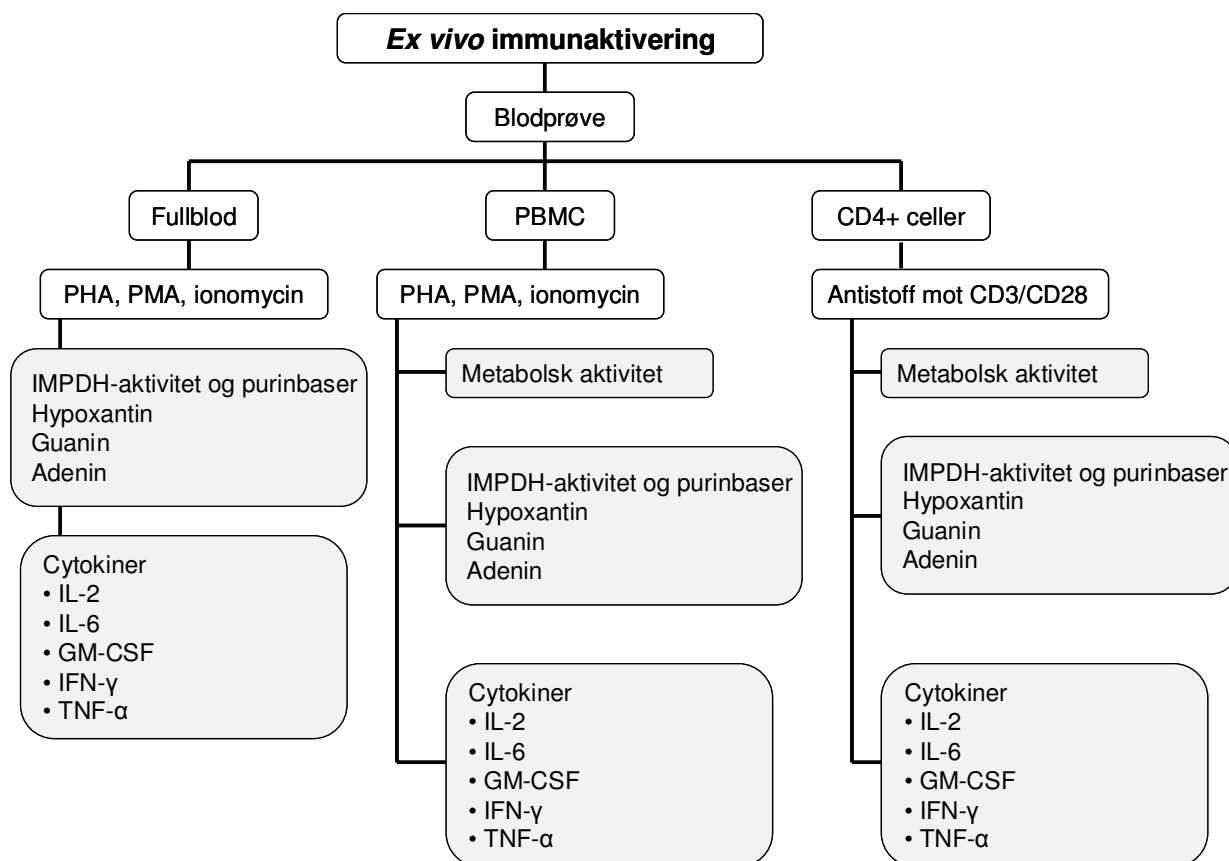
Perklorsyre stoppreagens/fellingsreagens:

4,0 mol/L

4 METODER

4.1 Metodeutvikling

For å etablere en metode til kvantifisering av biomolekylære markører (biomarkører) i immunceller, ble ulike prinsipper for *ex vivo* immunaktivering testet ut (figur 4). Begrepet *ex vivo* innebærer at cellene stimuleres til en reaksjon 'utenfor kroppen'. Ulike celletyper og stimuleringsreagenser ble undersøkt i forsøkene. Fullblod og PBMC ble aktivert med ulike kombinasjoner av mitogenene PHA-L, PMA og ionomycin med sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 5 µg/mL, 50 ng/mL og 2,5 µg/mL. Disse konsentrasjonene har tidligere vist seg å være gunstige i forbindelse med aktivering av immunceller (22,50). Isolerte CD4⁺ celler ble aktivert med antistoffer rettet mot TCR (CD3) og kostimulatorisk reseptor (CD28). Metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble målt som biomarkører.



Figur 4. Oversikt over hvilke celletyper, aktiveringsprinsipper og biomarkører som har blitt testet ut.

Figurtekst figur 4 CD4⁺ celler består hovedsakelig av T-lymfocytter. Med metabolsk aktivitet menes i denne forbindelse en generell aktivitet av dehydrogenaser. Mononukleære celler i perifert blod (PBMC), phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), phytohemagglutinin (PHA), inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH), interleukin (IL), granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ), tumor nekrose faktor- α (TNF- α).

4.2 Celleisolering

4.2.1 Mononukleære celler i perifert blod (PBMC)

Det ble tatt utgangspunkt i produktbeskrivelsen til Leucosep-rør for isolering av PBMC. Blod tappet i Na-Heparinrør (6 mL) ble vendt 6-8 ganger før sentrifugering ved 1000 g i 10 minutter (4 °C). Plasma ble pipettert av og overført til nytt sentrifugerør uten antikoagulant. Kaldt fosfatbufret saltvann (PBS) ble tilsatt sentrifugerøret med blodceller i samme mengde som fjernet plasma. Blod/PBS ble videre blandet 1:1 med PBS i et nytt sentrifugerør. Fortynnet blod (maksimum 8 mL) ble ved dekantering overført til Leucosep-røret og sentrifugert i romtemperatur ved 1000 g i 10 minutter.

De ulike komponentene i blodet ble separert etter tetthet. De mononukleære cellene lå i et lyst sjikt over polypropylenbarrieren i Leucosep-røret. Over dette sjiktet lå plasma og blodplater, mens erytrocytter og granulocytter passerte gjennom barrieren og la seg i bunnen av røret. Det øverste laget med plasma (ned til ca. 10 mm over PBMC-sjiktet) ble pipettert av og kastet. De mononukleære cellene ble deretter overført til nytt sentrifugerør. Cellene ble vasket ved å tilsette 5 mL kald PBS. Innholdet ble blandet ved å vende røret 6 ganger, og deretter sentrifugert i romtemperatur ved 250 g i 10 minutter. Supernatanten ble pipettert av og kastet. Pelleten med celler ble resuspendert i 1,00 mL kaldt medium A (RPMI 1640 med L-glutamin og NaHCO₃, tilsatt 125 U/mL Penicillin-Streptomycin). Deretter ble de mononukleære cellene talt.

Telling av celler

Mononukleære celler ble talt ved hjelp av en automatisert celleteller (Z1 Coulter Particle Counter). Ti μ L av cellesuspensjonen ble fortynnet i 19 mL isoton væske (Coulter Isoton Diluent). Celletelleren ble innstilt til å telle celler med størrelse 5-15 μ m. For å kompensere forholdet mellom opprinnelig og fortynnet cellesuspensjon, ble fortynningsfaktoren satt til 1901.

4.2.2. CD4⁺ celler

Prosedyren for Dynal® CD4 Positive Isolation Kit fra Invitrogen ble fulgt for isolering av CD4⁺ celler.

Vasking av isoleringskuler

Magnetiske isoleringskuler koblet til antistoffer mot CD4, ble suspendert ved miksing på vortexer i 30 sekunder. Tolv µL kulesuspensjon per mL fullblod og et overskudd på totalt 30 µL ble overført til et 1,5 mL polypropylenrør. Buffer 1 (PBS u/Ca²⁺ og Mg²⁺, tilsatt 0,1 % bovint serum albumin (BSA) og 2 mmol/L etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) ble tilsatt i samme volum som uttaksløsningen av kulesuspensjonen (minst 1 mL), og blandet på vortexer i 5 sekunder. 1,5 mL polypropylenrøret ble satt på magnet i 1 minutt og supernatanten kastet. Kulene ble resuspendert i buffer 1, i samme volum som det opprinnelige uttaksvolumet.

Celleisolering

Fullblod tappet i Na-Heparinrør (6 mL) ble kjølt ned til 2-8 °C. Isoleringskuler ble tilsatt røret med fullblod (12 µL per mL blod), og dette ble blandet forsiktig ved å vende røret 6 ganger. Fullblodet med isoleringskuler ble inkubert på rulle med tilting ved 2-8 °C i 20 minutter. Etter inkubering ble røret satt på magnet i 2 minutter og supernatanten ble overført til nytt reagensrør for å være kilde til plasma. Isoleringskulene med CD4⁺ celler koblet til seg, satt seg på innsiden av røret som var mot magneten, og ble vasket ved resuspending i 1 mL buffer 1. Deretter ble røret satt på magnet i 1 minutt og supernatanten ble kastet. Vaskeprosedyren ble gjentatt tre ganger. Etter vasking ble kule/CD4⁺-kompleksene resuspendert i 100 µL buffer 2 (RPMI 1640, tilsatt 1 % føtalt kalveserum (FCS)) per mL fullblod benyttet til isoleringen.

Frakobling av isoleringskuler

Frakoblingsreagens ble tilsatt reagensrøret med kule/CD4⁺-kompleksene for å koble isoleringskulene fra de isolerte cellene (10 µL frakoblingsreagens per mL fullblod opprinnelig benyttet; minimum 30 µL reagens). Røret ble deretter inkubert i romtemperatur på rulle med tilting i 45 minutter. Etter inkubering ble røret satt på magnet i 1 minutt og supernatanten med frakoblede CD4⁺ celler ble overført til nytt reagensrør. De gjenværende isoleringskulene ble vasket med 500 µL buffer 2, satt på magnet 1 minutt og supernatanten deretter overført til røret med cellesuspensjonen. Videre ble 4 mL buffer 2 tilsatt cellesuspensjonen og røret vendt 6 ganger. Røret ble sentrifugert i romtemperatur ved 400 g i 6 minutter og supernatanten ble

kastet. Cellene ble resuspendert i 100 µL medium A per mL fullblod, eller minimum 150 µL. De isolerte CD4⁺ cellene ble deretter talt.

Telling av celler

CD4⁺ celler ble talt som tidligere beskrevet for PBMC i avsnitt 4.2.1.

4.2.3 Fullblod

Blod ble tappet direkte i Na-Heparinrør (6mL) og rørene ble vendt 6-8 ganger.

4.3 Ex vivo aktivering av immunceller

4.3.1 Aktivering av PBMC

Isolerte PBMC ble fortynnet i medium A med 20 % plasma fra opprinnelig klinisk prøve. Cellekonsentrasjoner som varierte fra 200 000 til 2 000 000 celler/mL, ble testet ut til måling av metabolsk aktivitet, mens 1 600 000 celler/mL ble benyttet til kvantifisering av IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og utskillelse av cytokiner.

Femti µL celleduspensjon ble overført til brønner i 96 brønners brett i sluttkonsentrasjoner per brønn på 100 000 til 1 000 000 celler/mL (metabolsk aktivitet), og 200 µL celleduspensjon ble tilsatt 5 mL celledyrkingsrør i sluttkonsentrasjon på 800 000 celler/mL (IMPDH-aktivitet, purinbaser, cytokiner). Medium med og uten stimulanter ble blandet med celleduspensjonen i forholdet 1:1. Stimuleringsmedium med PMA 100 ng/mL, PHA 10,0 µg/mL og ionomycin 5,00 µg/mL i ulike kombinasjoner ble overført til henholdsvis brønner (50 + 50 µL; metabolsk aktivitet) og celledyrkingsrør (200 + 200 µL; IMPDH-aktivitet, purinbaser, cytokiner) hvor celler skulle aktiveres. Tilsvarende mengde medium C (uten stimulanter: RPMI 1640 med L-glutamin og NaHCO₃, tilsatt 200 U/mL Penicillin-Streptomycin og 0,72 % *dimethyl sulfoxide* (DMSO)) ble tilsatt brønner og rør hvor celler ikke skulle aktiveres. Korkene på celledyrkingsrørene har to trinn: løs og fast påsetting. Korkene ble festet løst på celledyrkingsrørene under inkuberingen slik at gassutveksling var mulig.

Brett med lokk ble satt på platerister ved hastighet 300 vendinger/min i 1 minutt. Innholdet i rørene ble blandet forsiktig ved å svinge røret for hånd. Brett og rør ble deretter satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet. Inkuberingstiden varierte fra

0-72 timer. Metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble deretter kvantifisert.

4.3.2 Aktivering av CD4⁺ celler

Prosedyren for Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 fra Invitrogen ble fulgt for aktivering av CD4⁺ celler.

Vasking av aktiveringskuler

Aktiveringskulene ble resuspendert ved miksing på vortexer i 30 sekunder. To µL aktiveringskuler per 100 µL cellesuspensjon og et overskudd på totalt 6 µL ble overført til 1,5 mL polypropylenrør. Buffer 1 ble tilsatt i samme volum som uttaksløsningen av kulesuspensjonen (minst 1 mL) og blandet på vortexer i 5 sekunder. 1,5 mL polypropylenrøret ble satt på magnet i 1 minutt og supernatanten kastet. Kulene ble resuspendert i medium A, i samme volum som det opprinnelige uttaksvolumet av aktiveringskulene, og blandet på vortexer i 5 sekunder.

Tilsetning av aktiveringskuler til cellesuspensjon

De CD4⁺ cellene ble fortynnet til 800 000 celler/mL i medium A med 10 % plasma (eller kalveserum). Under metodeutviklingen ble ulike typer plasma/serum testet ut; plasma fra klinisk prøve, filtrert plasma fra klinisk prøve og kalveserum. Kalveserum inngår i produktbeskrivelsen for aktivering av CD4⁺ celler. For å inkludere effekten av de immundempende legemidlenes plasmakonsentrasjon i testsystemet, var det ønskelig å erstatte kalveserum med plasma fra samme prøve som cellene isoleres fra. Uttestingen av plasma og kalveserum som tilsetning i mediet ble gjort med metabolsk aktivitet som biomarkør på immunaktivering.

Supernatanten som ble tatt vare på under avsnitt 4.2.2 fungerte som kilde til plasma og filtrert plasma fra den opprinnelige kliniske prøven. Supernatanten ble sentrifugert ved 1000 g i 5 minutter (4 °C) og plasma ble pipettert av. Deler av plasmaandelen ble filtrert ved hjelp av mikrofiltreringsrør på 0,1 µm for å fjerne blodplater og platederiverte vesikler. Filtringen ble utført ved sentrifugering i romtemperatur ved 2000 g i 5 minutter.

Volum på 100 µL og 300 µL cellesuspensjon ble overført til henholdsvis brønner (metabolsk aktivitet) og rør (IMPDH-aktivitet, purinbaser, cytokiner). To µL aktiveringskuler per 100 µL cellesuspensjon ble tilsatt brønner og rør der celler skulle aktiveres.

Tilsvarende mengde medium A ble tilsatt brønner og rør med celler som ikke skulle aktiveres. Brett med lokk ble satt på platerister ved hastighet 300 vendinger/min i 1 minutt. Innholdet i rørene ble blandet forsiktig ved å svinge rørene for hånd. Deretter ble brett og rør satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet, og de ble inkubert i 72 timer. Disse betingelsene har tidligere vist seg å fungere tilfredsstillende ved tilsetning av kalveserum i dyrkingsmediet (51). Metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble deretter kvantifisert i de CD4⁺ cellene.

4.3.3 Aktivering av fullblod

Et volum på 200 µL fullblod fra Na-Heparinrør (6 mL) ble overført til 5 mL celledyrkingsrør. Et likt volum stimuleringsmedium med PMA, PHA og ionomycin i ulike kombinasjoner med sluttkonsentrasjon i rør på henholdsvis 50 ng/mL, 5 µg/mL og 2,5 µg/mL ble tilsatt rørene med fullblod som skulle aktiveres (200 + 200 µL). Tilsvarende volum (200 µL) medium C ble tilsatt rørene med fullblod som ikke skulle aktiveres. Innholdet i rørene ble blandet forsiktig ved å svinge røret for hånd, og deretter satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet. Inkuberingstiden varierte fra 0-72 timer. IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble deretter kvantifisert.

4.4 Kvantifisering av molekulære biomarkører

4.4.1 Metabolsk aktivitet i PBMC og CD4⁺ celler

Metabolsk aktivitet ble kvantifisert som mål på cellenes generelle aktiveringsgrad. Aktiveringsgraden gjenspeiler cellenes evne til proliferasjon og levedyktighet. Kvantifiseringen av metabolsk aktivitet ble utført ved hjelp av celleproliferasjonsreagenset WST-1 i henhold til produktbeskrivelsen til Cell Proliferation Reagent WST-1, og er basert på kolometri. Prolifererende cellers dehydrogenaser omdanner WST-1 til formazan som absorberer lys ved 450 nm. Mengde formazan som dannes korrelerer direkte med antall metabolsk aktive celler og kan kvantifiseres ved absorbansmåling.

Praktisk utførelse

Etter inkubering ble 10 µL WST-1 tilsatt hver brønn med cellesuspensjon som enten hadde blitt aktivert eller ikke aktivert etter celleisolering. Brett med lokk ble satt på platerister med hastighet 300 vendinger/min i 1 minutt og deretter i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og

95 % luftfuktighet. Ulike inkuberingstider med tilsatt WST-1 ble testet ut for CD4+ celler. Avlesning ble utført etter henholdsvis 1-6 timer. Etter inkubering med WST-1 ble brettet tildekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie for å begrense påvirkning av bakgrunnsabsorbansen, og det ble satt på platerister i 1 minutt. Deretter ble brettet satt i plateleseren og absorbansen lest av ved 450 nm (1 sekund måling per brønn).

4.4.2 Purinbaser og IMPDH-aktivitet i PBMC og CD4+ celler

Aktiviteten til IMPDH og nivåene av purinbasene hypoxantin, adenin og guanin ble kvantifisert ved hjelp av en analysemetode basert på væskekromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS).

Praktisk utførelse

Etter inkubering ble cellesuspensjonene i celledyrkingsrørene blandet forsiktig og sentrifugert ved 1000 g i 5 minutter (4 °C). Deretter ble 200 µL supernatant overført til 1,5 mL polypropylenrør, fryst og lagret ved -70 °C til analyse av cytokiner. Celledyrkingsrørene ble tilsatt 500 µL PBS og cellene ble resuspendert ved pipettering opp og ned 4-5 ganger før alt innholdet ble overført til nytt 1,5 mL polypropylenrør. Rørene ble sentrifugert ved 2 350 g i 2 minutter (4 °C) og supernatanten ble avpipetert og kastet. Cellepelletten ble tilsatt 125 µL PBS og resuspendert ved hjelp av vortexer i 3-5 sekunder. Cellesuspensjonen ble deretter fryst og lagret ved -70 °C til analyse av IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser.

Fryst cellesuspensjon ble tint 20 minutter i romtemperatur. Cellelysats ble homogenisert ved blanding på vortexer i 30 sekunder, ultralydbad i 120 sekunder, blanding på vortexer i 10 sekunder og deretter sentrifugert ved 1 150 g i 2 minutter (4 °C).

Femti µL cellelysats ble overført til 1,5 mL mikrosentrifugerør. Femti µL løsning med kalibratorer, kontroller eller PBS (bakgrunnsprøve) ble på tilsvarende måte overført til aktuelle rør. Blanke prøver bestod av vann. Et volum på 50 µL assay-buffer inneholdende tris-hydroklorid (Tris-HCl) 250 mmol/L, EDTA 7,5 mmol/L, kaliumklorid (KCl) 250 mmol/L og ditiotreitrol (DTT) 5,0 mmol/L ble tilsatt alle rørene. Rør med kalibratorer, kontroller og cellelysats som det skulle måles nivå av purinbaser i (dvs. prøvene som ikke skulle inkuberes for måling av IMPDH-aktivitet), ble tilsatt 25 µL vann. Rør med cellelysats hvor IMPDH-aktivitet skulle kvantifiseres, samt bakgrunnsprøver, ble tilsatt 25 µL substrat/kofaktor-

løsning inneholdende IMP 9,0 mmol/L og NAD 2,0 mmol/L. Alle rørene ble vortexet i 5 sekunder, og IMPDH- og bakgrunnsprøvene ble inkubert i vannbad ved 37 °C i 120 minutter.

For å stoppe enzymreaksjonen og felle proteiner, ble de inkuberte rørene satt på is og 20 µL perklorisyre (HClO₄) 4,0 mol/L ble tilsatt hvert rør. En løsning med internstandarder som inneholdt ¹⁵N₂-xanthin, D₂-hypoxantin, ¹³C, ¹⁵N₂-guanine og ¹³C₅-adenine (25 µmol/L av hver) ble tilsatt hvert rør, vortexet i 10 sekunder og sentrifugert ved 9 400 g i 4 minutter (4 °C). Deretter ble 120 µL supernatant overført til 250 µL flatbunnet glassinsert i 2 mL vial og kork satt på. Vialene ble plassert i varmeblokk ved 100 °C i 60 minutter for å hydrolysere purinnukleotidene til frie purinbaser og ribose (mono/di/tri-fosfater).

Etter koking ble vialene avkjølt ved romtemperatur i 10 minutter. Videre ble det tilsatt 15 µL kaliumacetat 4,0 mol/L for å fjerne perklorat ved utfelling av kaliumperklorat. Vialene ble vortexet i 5 sekunder, sentrifugert i romtemperatur ved 2000 g i 5 minutter og plassert i autosamplere i væskechromatografiinstrumentet til kvantitativ analyse.

Purinbasene xantin, hypoxantin, guanin og adenin ble kvantifisert ved hjelp av en etablert analysemetode basert på LC-MS/MS. Instrumentet bestod av en LC-modul (Waters 2795 Separations Module) og et massespektrometer med elektrospy ionisering (Waters Quattro micro API). Programvaren Waters MassLynx ble brukt til dataanalysen.

Omvendt-fase-kromatografi ble anvendt til separasjonen der den analytiske kolonnen var en Waters Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 × 150 mm, med forkolonne Waters Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 × 10 mm. Mobilfasen bestod av 3 % acetonitril i vann, tilsatt 0,1 % maursyre og 2 mmol/L ammoniumacetat. Maursyre og ammoniumacetat virker som pH-stabiliserende buffere, og acetonitril avgjør løsemiddelstyrken. Mobilfasen ble pumpet med en hastighet på 0,150 mL/min og injeksjonsvolumet var 30 µL. Injeksjonsnålen ble vasket med 5 % acetonitril i vann mellom hver injeksjon. Prøvene ble injisert med 8 minutters mellomrom og mobilfasen ble ført inn i massespektrometeret mellom 4,5 og 7,9 minutter.

Elektrospy ble brukt som fordampings/-ioniseringsteknikk og positive ioner i gassfase ble ført inn i massespektrometeret. Kapillærspenningen ble satt til 3,00 kV, ionekildetemperaturen til 120 °C og gassfasetemperaturen til 400 °C. Nitrogen ble brukt som nebulisatorgass og cone-gass med hastighet på henholdsvis 650 L per time og 50 L per time.

Molekylionene ble fragmentert ved hjelp av argongass justert til $3,5 \times 10^{-3}$ mBar. Betingelser for hvert enkelt molekylions masse/ladning (m/z)-overgang er angitt i tabell A.

Tabell A. Betingelser for masse/ladning (m/z)-overganger

Analytt (Internstandard)	Forløperion (m/z)	Produksjon (m/z)	Dwell-tid (sek)	Cone- spenning (V)	Kollisjonsenergi (eV)
Xantin	152,95	109,95	0,350	32	17
($^{15}\text{N}_2$ -xantin)	154,95	110,97	0,350	34	17
Hypoxantin	136,90	109,95	0,300	40	20
(D ₂ -hypoxantin)	138,98	110,98	0,300	40	18
Guanin	151,95	134,95	0,225	37	18
(^{13}C , $^{15}\text{N}_2$ -guanin)	154,96	137,96	0,225	35	17
Adenin	135,95	118,95	0,050	39	20
($^{13}\text{C}_5$ -adenin)	141,03	123,91	0,050	39	20

Protonerte molekylioner (positive ioner) ble analysert ved hjelp av multiplere reaksjonsmonitorering (MRM)

Toppene i kromatogrammet ble integrert, og ratio mellom analyttenes og internstandardenes toppareal ble brukt som respons. For å beregne konsentrasjonene ble det benyttet lineære kalibreringskurver med 1/x vekting (ikke tvunget gjennom origo). Følgende konsentrasjoner av kalibratorer ble brukt: Xantosin 0,50 – 2,50 – 10,0 – 50,0 – 100 µmol/L, IMP 0,50 – 1,00 – 10,0 – 40,0 – 80,0 µmol/L, guanosinmonofosfat (GMP) 1,00 – 5,00 – 20,0 – 100 – 200 µmol/L og adenosinmonofosfat (AMP) 2,50 – 12,5 – 50,0 – 250 – 500 µmol/L. Aktiviteten til enzymet IMPDH ble beregnet som maksimal produksjonshastighet av XMP (pmol XMP/10⁶ celler/min), der målt xantin står i ekvimolart forhold til XMP i inkuberte prøver. På grunn av at tilsatt IMP i de inkuberte prøvene inneholdt en liten mengde XMP eller xantin, var det nødvendig å trekke målt xantin i bakgrunnsprøvene fra prøvesvarene.

Presisjon og nøyaktighet innen og mellom analyseserier er tidligere dokumentert for metoden. Purinbasene måles med variasjonskoeffisienter (VK) som er lavere enn 10 %, og nøyaktigheten er mellom 96 og 110 %.

4.4.3 Cytokiner utskilt ved aktivering av fullblod, PBMC og CD4⁺ celler

Utskillelse av IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α kan kvantifiseres ved hjelp av et multiplex assay basert på Luminex-teknologien (52). Protokollen for Bio-PlexTM Cytokine Assay ble fulgt. Med et slikt multiplex assay kan flere (inntil 100 cytokinener) kvantifiseres samtidig i en enkelt prøve. Dette er tidsbesparende og gunstig når prøvevolumet er begrenset. De ulike cytokinene blir skilt fra hverandre ved hjelp av fluorescensmerkede magnetkuler. Hver kule har en spesifikk fluorescens som er relatert til hvert enkelt cytokin. Cytokinene i prøven blir bundet til de aktuelle kulene ved hjelp av antistoffer som er kovalent bundet til magnetkulene. Spesifikke deteksjonsantistoffer merket med det fluorescerende stoffet phycoerythrin (PE), vil deretter binde seg til sine tilhørende cytokiner. Et cytokin er da bundet samtidig til både en kule og PE, og kan detekteres i en Luminex-basert plateleser ved hjelp av to laserstråler med ulike bølgelengder. En rød (635 nm) laserstråle eksiterer de fluorescensfargede magnetkulene og emisjonssignalet brukes til å identifisere hvilket cytokin det er. En grønn (532 nm) laserstråle genererer et kvantitativt signal ved å eksitere PE.

Praktisk utførelse

Etter inkubering ble celledyrkingsrørene med henholdsvis aktivert og ikke-aktivert fullblod, PBMC og CD4⁺ celler blandet forsiktig ved å svinge rørene for hånd, og de ble sentrifugert ved 1000 g i 5 minutter (4 °C). Deretter ble 200 μ L supernatant overført til 1,5 mL polypropylenrør, fryst og lagret ved -70 °C.

Fryste supernatanter ble tint i romtemperatur i 20 minutter og deretter satt på is. Standardprøven ble rekonstituert i 500 μ L medium B (RPMI 1640 med 0,5 % BSA), vortexet i 30 sekunder og satt på is i 30 minutter. Deretter ble en standardrekke med åtte ulike konsentrasjoner preparert. Det ble overført 128 μ L rekonstituert standardløsning til et mikrosentrifugerør som inneholdt 72 μ L medium B, og røret ble vortexet 5 sekunder. Deretter ble standardrekken tillaget ved en 4 ganger fortynning fra standard 1 til standard 8. Løsningene ble vortexet 5 sekunder mellom hver overføring. Kalibreringsområdet til cytokinene var: IL-2 (0,5-10201 pg/mL), IL-6 (1,7-27471 pg/mL), GM-CSF (0,9-14013), IFN- γ (1,7-28364 pg/mL) og TNF- α (5,5-89331 pg/mL).

Supernatanter fra henholdsvis aktivert fullblod, PBMC og CD4⁺ celler ble fortynnet 10 ganger og supernatanter fra ikke-aktivert fullblod, PBMC og CD4⁺ celler 2 ganger i medium B. Løsningen med antistoffkoblede kuler ble tillaget ved å fortynne 10 ganger i Bio-Plex assay buffer. Røret med tillaget kulesuspensjon ble tildekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie og vortexet i 10 sekunder.

Det ble tilsatt 100 µL Bio-Plex assay buffer til alle brønnene i filterplaten som deretter ble filtrert på vakuumpumpe. Et volum på 50 µL kulesuspensjon ble deretter tilsatt hver brønn og filtrert. Filteret ble vasket ved å tilsette 100 µL vaskebuffer og deretter filtrere. Vaskeprosedyren ble utført to ganger. Videre ble det overført 50 µL standardløsninger (to paralleller av hver standard), kontroller og prøver til aktuelle brønner. Filterplaten ble forseglest med plast, dekket til med aluminiumsfolie og inkubert på platerister med lokk ved 300 rpm i 30 minutter.

Etter inkubering med antistoffkoblede kuler ble standarder, kontroller og prøver filtrert på vakuumpumpe og filteret vasket tre ganger med 100 µL vaskebuffer. Løsning med deteksjonsantistoffer ble tillaget ved å fortynne 10 ganger i deteksjonsantistoff-diluent, og røret ble vortexet i 10 sekunder. Deretter ble 25 µL tillaget deteksjonsantistoff-løsning tilsatt hver brønn. Filterplaten ble forseglest med plast, dekket til med aluminiumsfolie og inkubert på platerister med lokk ved 300 rpm i 30 minutter.

Etter inkubering med deteksjonsantistoff ble platen filtrert og vasket tre ganger med 100 µL vaskebuffer i hver brønn. Løsning med streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) ble tillaget ved å fortynne 100 ganger i Bio-Plex assay buffer, tildekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie, og vortexet i 10 sekunder. Deretter ble 50 µL SA-PE løsning tilsatt hver brønn. Filterplaten ble forseglest med plast, dekket til med aluminiumsfolie og inkubert på platerister ved 300 rpm i 10 minutter.

Etter inkubering med SA-PE ble platen filtrert og vasket tre ganger med 100 µL vaskebuffer i hver brønn. Det ble tilsatt 125 µL Bio-Plex assay buffer til hver brønn. Filterplaten ble forseglest med plast og satt på platerister ved 1100 rpm i 30 sekunder. Deretter ble filterplaten satt i Bio-Plex instrumentet og cytokinene ble detektert av en photomultiplier tube med innstillingen "lav", for optimal sensitivitet. Den tilhørende programvaren Bio-Plex

ManagerTM ble brukt til å konstruere kalibreringskurver og beregne cytokinkonsentrasjonene (pg/mL). Innledningsvis ble fluorescensintensiteten benyttet som måleenhet.

4.5 Biomarkørenes respons på immundempende

legemidler

Valg av celletype, stimuleringsmedium og inkuberingstid til dette forsøket ble bestemt på bakgrunn av resultater fra metodeutviklingen hvor betingelser for *ex vivo* immunaktivering ble testet ut.

De molekylære biomarkørenes sensitivitet overfor immundempende legemidler ble testet ut ved å tilsette ulike konsentrasjoner takrolimus, CsA, MPA, prednisolon, everolimus og sirolimus til PBMC og fullblod som ble aktivert (tabell B). I PBMC ble metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse kvantifisert. I fullblod ble det målt cytokinutskillelse.

Legemidler løst i metanol ble tilsatt til brønner og celledyrkingsrør, henholdsvis 2 uL og 8 uL legemiddelløsning. I brønnene ble det målt metabolsk aktivitet i PBMC. I rørene ble det målt IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse i PBMC, samt cytokinutskillelse i fullblod. Tilsvarende mengde metanol ble overført til brønner og rør hvor cellene ikke skulle eksponeres for de ulike legemidlene.

Til analyse av metabolsk aktivitet i PBMC ble 50 µL celleduspensjon (800 000 celler/mL fortynnet i medium A og 20 % plasma) overført til brønner i 96-brønners brett. Til analyse av IMPDH-aktivitet, purinbaser og cytokiner i PBMC ble 200 µL celleduspensjon (1 600 000 celler/mL fortynnet i medium A og 20 % plasma) overført til små celledyrkingsrør. Til analyse av cytokinutskillelse i fullblod ble 200 µL heparinblod overført til små celledyrkingsrør.

Femti µL og 200 µL stimuleringsmedium med PMA og ionomycin (sluttkonsentrasjon på 50 ng/mL og 2,5 µg/mL i brønn/rør) ble overført til henholdsvis brønner og rør hvor PBMC og fullblod skulle aktiveres. Tilsvarende mengde medium C uten stimulanter ble tilsatt brønner og rør hvor PBMC og fullblod ikke skulle aktiveres. Brett med lokk ble satt på platerister ved

hastighet 300 vendinger/min i 1 minutt og innhold i rør ble blandet ved å svinge røret for hånd. Korkene var satt løst på celledyrkingsrørene for å tillate gassutveksling. Deretter ble prøvene satt i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet i 72 timer.

Etter inkubering ble 10 µL WST-1 tilsatt hver brønn for analyse av metabolsk aktivitet i PBMC. Brett med lokk ble satt på platerister ved hastighet 300 vendinger/min i 1 minutt og deretter i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO₂ og 95 % luftfuktighet i 4 timer. For å begrense påvirkning av bakgrunnsabsorbansen ble brettet tildekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie etter inkubering, og satt på platerister i 1 minutt før det ble satt i plateleseren og lest av (absorbans ved 450 nm). Innhold i rør ble blandet ved å svinge røret for hånd, og sentrifugert ved 1000 g i 5 minutter (4 °C). Deretter ble prøvene håndtert og opparbeidet til analyse av IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinanalyse som tidligere beskrevet.

Tabell B. Legemiddelkonsentrasjoner brukt til responskurver

Legemiddel	Sluttkonsentrasjoner							
Prednisolon (µmol/L)	0,50	5,00	10,0	20,0	40,0	500	1000	2000
Mykofenolat (µmol/L)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	6,00	60,0
Ciklosporin (nmol/L)	1,00	2,50	10,0	25,0	100	250	1000	10000
Everolimus (nmol/L)	0,10	0,25	1,00	2,50	10,0	100	1000	5000
Sirolimus (nmol/L)	0,10	0,25	1,00	2,50	10,0	100	1000	5000
Takrolimus (nmol/L)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	2,50	10,0	100

4.6 Pilotstudie

For å studere effektene den immundempende behandlingen har på biomarkørene, ble den utviklede metoden som tar for seg *ex vivo* immunaktivering og deretter kvantifisering av biomarkører, prøvd ut som en del av pilotstudien: *Molekylære biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte*. Studien ble utført ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet og inkluderte nyretransplanterte pasienter. Studien var på forhånd godkjent av REK. Det ble innhentet skriftlig informert samtykke fra alle pasientene som deltok i studien. Pasientenes informasjonsskriv er vedlagt i Appendix I.

Hensikten med studien er å videreutvikle prinsipper for kvantifisering av biomarkører hos nyretransplanterte, fremlegge ny kunnskap om immundempende legemidlers virkningsmekanismer, samt frembringe hypoteser om sammenhengen mellom biomarkører og klinisk effekt av legemidlene. Studien er en kohort observasjonsstudie. Pasienter over 18 år som mottar nyre fra levende donor ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet blir spurt om studiedeltakelse og deltakerne rekrutteres fortløpende i forhold til transplantasjonstidspunkt. Pasientene behandles i henhold til standard immundempende protokoll for nyretransplanterte ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet.

Hver deltaker ble tappet for et ekstra blodvolum i forbindelse med rutinemessig prøvetaking. Venøse blodprøver ble tatt 0-4 dager før nyretransplantasjon og oppstart med immundempende legemidler. Nye prøver ble tatt 6-9 dager og 5-7 uker etter nyretransplantasjon, henholdsvis rett før legemiddeldose (t_0) og 1,5 timer etter legemiddeldose ($t_{1,5}$). Det skal også tas prøver 1 år etter nyretransplantasjon rett før inntak av legemiddeldose men dette tidspunktet ble ikke tatt med i denne masteroppgaven.

Pasientenes sensitivitet overfor immundempende legemidler ble testet ut før transplantasjon ved hjelp av legemiddelresponskurver med metabolsk aktivitet (WST-1) som markør. Metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble kvantifisert både før transplantasjon og ved begge studiedagene etter transplantasjon.

4.7 Beregninger

Ved beregning av aktiveringsgrad trekkes bakgrunnsabsorbansen i blanke prøver (uten celler) fra målingene. Deretter beregnes metabolsk aktivitet i aktiverte celler i prosent av metabolsk aktivitet i ikke-aktiverede celler. Legemiddelresponskurver og variablene som beskriver legemiddelrespons på *ex vivo* immunaktivering (IC_{50} , maksimal inhibering og minimumsnivå) ble estimert ved hjelp av nonlinear regresjonsanalyse (4 parameters likning: GraFit Version 5 programvare). AUC_r (arealet under legemiddelresponskurven) ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden basert på faktiske målinger.

Det ble valgt å ikke utføre statistiske analyser i pasientmaterialet siden det kun var fem pasienter som inngikk. Beskrivelse av resultater ble derfor gjort ut ifra observerte medianverdier og må hovedsakelig anses som tendenser.

5 RESULTATER

5.1 Utprøving av betingelser for *ex vivo* immunaktivering

Til forsøkene i metodeutviklingen ble det benyttet blod fra fire friske, frivillige personer: To menn og to kvinner i alderen 23 – 52 år. Metabolsk aktivitet av dehydrogenaser, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse ble kvantifisert og brukt som markører ved uttesting og etablering av betingelser for *ex vivo* immunaktivering.

5.5.1 Metabolsk aktivitet som biomarkør

PBMC fra fullblod aktivert med PHA, PMA og ionomycin

Aktivering av fullblod og etterfølgende isolering av PBMC var den første *ex vivo* immunaktiveringsmetoden som ble testet ut i metodeutviklingen. Fullblod ble aktivert med PHA, PMA og ionomycin i ulike kombinasjoner med sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 5 µg/mL, 50 ng/mL og 2,5 µg/mL. For å kvantifisere metabolsk aktivitet etter aktivering direkte i fullblod, må PBMC isoleres og telles etter inkubering. Aktivert fullblod viste tegn til hemolyse under inkubering ved 37 °C frem til 72 timer, noe som vanskeliggjorde gradientsentrifugering, isolering og telling av PBMC i etterkant. Dette gjorde at kvantifisering av metabolsk aktivitet i PBMC isolert fra aktivert fullblod ikke lot seg gjennomføre.

CD4⁺ celler aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28

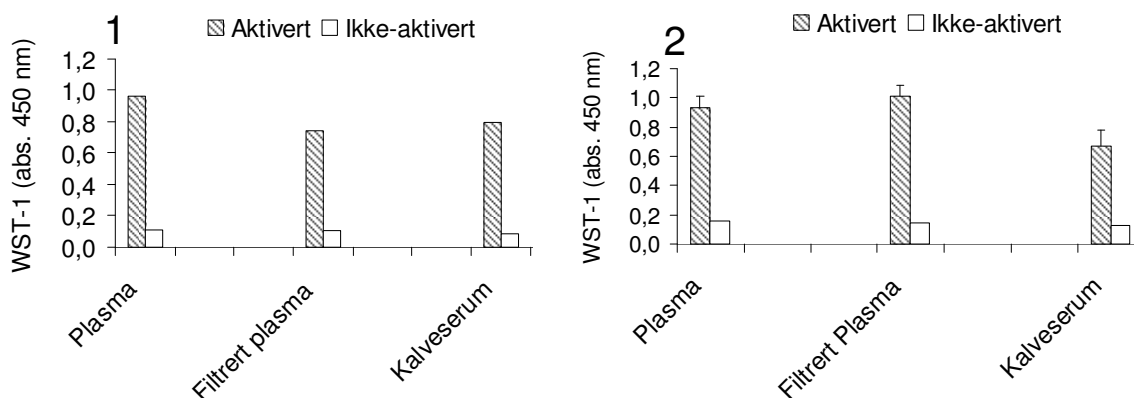
Metabolsk aktivitet ble kvantifisert i CD4⁺ celler etter inkubering ved 37 °C i 72 timer. Dette har tidligere vist seg å fungere tilfredsstillende med kalveserum som tilsetning i medium A (51). Cellene ble aktivert ved tilsetning av kuler dekket med antistoffer mot CD3 og CD28. Det skulle undersøkes om det var mulig å erstatte kalveserum med plasma fra samme blodprøve som cellene ble isolert fra. Her ble metabolsk aktivitet brukt som markør på immunaktivering. I tillegg skulle ulike inkuberingstider for WST-1-reaksjonen undersøkes.

Utprøving av plasma og kalveserum som tilsetning i medium A

Isolerte CD4⁺ celler ble fortynnet til 800 000 celler/mL i medium A med henholdsvis 10 % heparin-plasma fra klinisk prøve, 10 % filtrert (0,1 µm) heparin-plasma fra klinisk prøve eller 10 % kalveserum. Det ble utført to tilsvarende forsøk (1 og 2) med blod fra samme person. I hvilken grad de ulike plasmatypene og kalveserum påvirket immunaktiveringen (metabolsk aktivitet), er vist i figur 5. Det var 5-9 ganger økt metabolsk aktivitet i brønner med aktiverte

CD4⁺ celler, sammenliknet med ikke-aktiverte celler. Metabolsk aktivitet i aktiverte celler tilsatt plasma i forsøk 1 og 2 var henholdsvis 18 % og 29 % høyere i forhold til aktiverte celler fortynnet i kalveserum. Filtrert plasma ga tilsvarende resultater som ikke-filtrert plasma. I den videre metodeutviklingen ble det valgt å bruke heparin-plasma fra opprinnelig klinisk prøve som tilsetning i medium A. Dette gjaldt ikke bare metabolsk aktivitet som biomarkør, men også de andre aktuelle biomarkørene i både CD4⁺ celler og PBMC.

I forsøk 2 ble målingene for aktiverte celler utført i triplikater. Her var VK i området 0,5 % til 17 %.



Figur 5. *Ex vivo* immunaktivering av CD4⁺ celler og tilsetning av plasma fra klinisk prøve sammenlignet med kalveserum. To forsøk (1 og 2) med celler og plasma fra en frisk person. Metabolsk aktivitet (WST-1) ble målt som markør på celleaktiveringen. Mediet RPMI 1640 ble tilsatt 10 % heparin-plasma, 10 % filtrert (0,1 µm) heparinplasma eller 10 % kalveserum. Cellene ble aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28. Cellekonsentrasjon 800 000 celler/mL. Inkuberingstid 72 timer. WST-1 ble tilsatt aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler og absorbans ble lest av etter 4 timers inkubering. Absorbans i blank prøve er trukket fra.

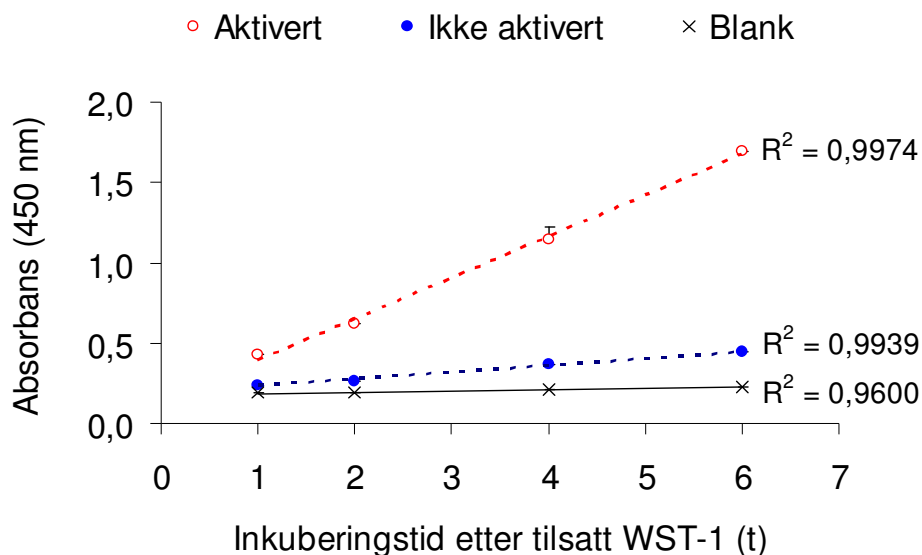
1) Gjennomsnitt, n = 2. 2) Gjennomsnitt ± std.avvik, n = 3 (aktivert), gjennomsnitt, n = 2 (ikke-aktivert).

Utprøving av inkuberingstider for WST-1

Etter 72 timers inkubering ble WST-1 tilsatt brønner med aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler. Ulike inkuberingstider for celler tilsatt WST-1 ble testet ut, der absorbansen (450 nm) ble kvantifisert etter henholdsvis 1, 2, 4 og 6 timers inkubering. Absorbansen ble plottet mot inkuberingstid og resultatet er vist i figur 6. Absorbansen steg tilnærmet lineært med økende inkuberingstid frem til 6 timer. Basert på lineær regresjonsanalyse ble det beregnet R²-verdier på henholdsvis 0,9974 Og 0,9939 for aktiverte og ikke-aktiverte celler. Bakgrunnsabsorbansen (blank uten celler) var tilnærmet konstant gjennom tidsintervallet

(0,190 ved 4 timer og 0,223 ved 6 timer). Fire timer ble valgt som inkuberingstid for WST-1 til kvantifisering av metabolsk aktivitet i CD4⁺ celler og PBMC i videre forsøk.

Målingene for aktiverte celler ved 4 timers inkuberingstid ble utført i triplikater og hadde VK på median 0,95 % (0,22 % - 13,1 %).



Figur 6. Utprøving av inkuberingstider etter tilsatt WST-1 i CD4⁺ celler. Metabolsk aktivitet (WST-1) ble målt som markør på celleaktivering. Celler fra en frisk person ble fortynnet til 800 000 celler/mL i RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma. Cellene ble aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28. WST-1 ble tilsatt etter 72 timers inkubering. Inkuberingstider etter tilsatt WST-1: 1 – 2 – 4 – 6 timer. Gjennomsnitt \pm std.avvik, $n = 3$ (aktivert, 4 timer). Gjennomsnitt, $n = 2$ (ikke aktivert, 4 timer), $n = 1$ (aktivert og ikke aktivert, 1 – 2 – 6 timer). R^2 ble beregnet ved lineær regresjonsanalyse.

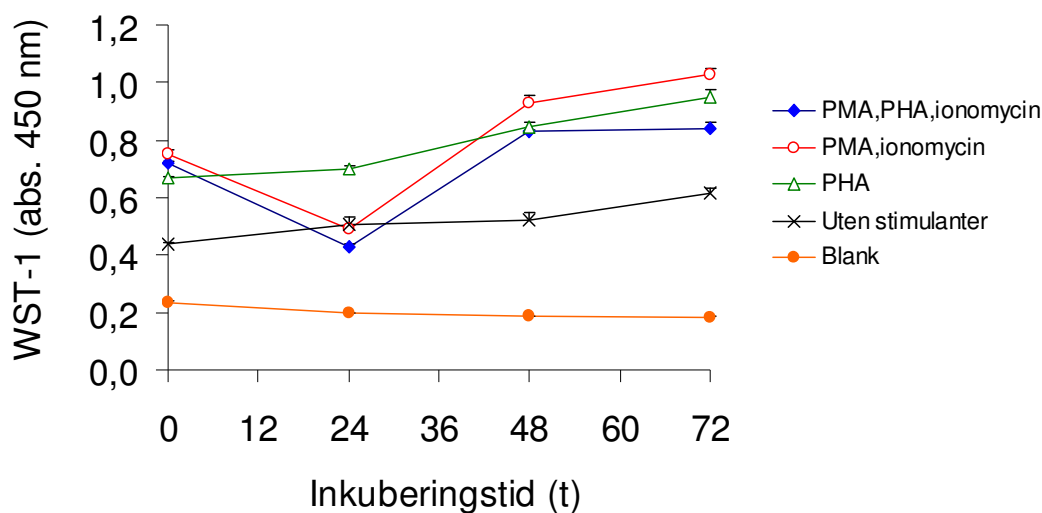
Utprøving av stimulanter og inkuberingstid for PBMC

Videre i metodeutviklingen ble det forsøkt å aktivere PBMC med PHA, PMA og ionomycin i ulike kombinasjoner med sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 5,0 $\mu\text{g/mL}$, 50 ng/mL og 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Metabolsk aktivitet ble brukt som markør på immunaktivering i denne utprøvingen som lå til grunn for valg av stimuleringsmedium, inkuberingstid og cellekonsentrasjon.

På bakgrunn av tilsvarende forsøk i CD4⁺ celler, ble PBMC fortynnet til 800 000 celler/mL i medium A med heparin-plasma fra klinisk prøve og aktivert ved tilsetning av stimulantene i ulike kombinasjoner. Metabolsk aktivitet ble kvantifisert etter inkubering i 0, 24, 48 og 72 timer. Tre tilsvarende forsøk med PBMC fra tre friske personer ble utført. Det ble observert tilsvarende resultater for de tre personene. Resultater fra et av forsøkene med PBMC fra

person B, hvor metabolsk aktivitet (absorbans) ble plottet mot inkuberingstid, er vist i figur 7 som et eksempel. Den metabolske aktiviteten i aktiverte celler var høyere sammenlignet med ikke-aktiverte celler ved 48 og 72 timer. Der PHA var tilsatt som stimulant, steg den metabolske aktiviteten forholdsvis jevnt fra 0 til 72 timer. PMA og ionomycin reduserte den metabolske aktiviteten ved 24 timer, men forårsaket en betydelig økning frem til 72 timer. Høyest metabolsk aktivitet etter 72 timers inkubering ble observert der PBMC var aktivert med PMA og ionomycin. Stimulantene medførte tilsynelatende forhøyet metabolsk aktivitet også ved 0 timer. Det ble kontrollert at ingen av stimulantene bidro til absorbansen ved 450 nm. Absorbans på 0,10 ble målt for medium uten stimulanter og medium med PMA og ionomycin. Dobbelt så høy absorbans ble målt i mediene som var tilsatt PHA.

Absorbansmålingene i de tre forsøkene hadde VK på median 2,5 % (0,6 % - 5,9 %), 1,4 % (0,4 % - 17,6 %) og 2,9 % (0 % - 34,1 %), n = 3 per målepunkt.

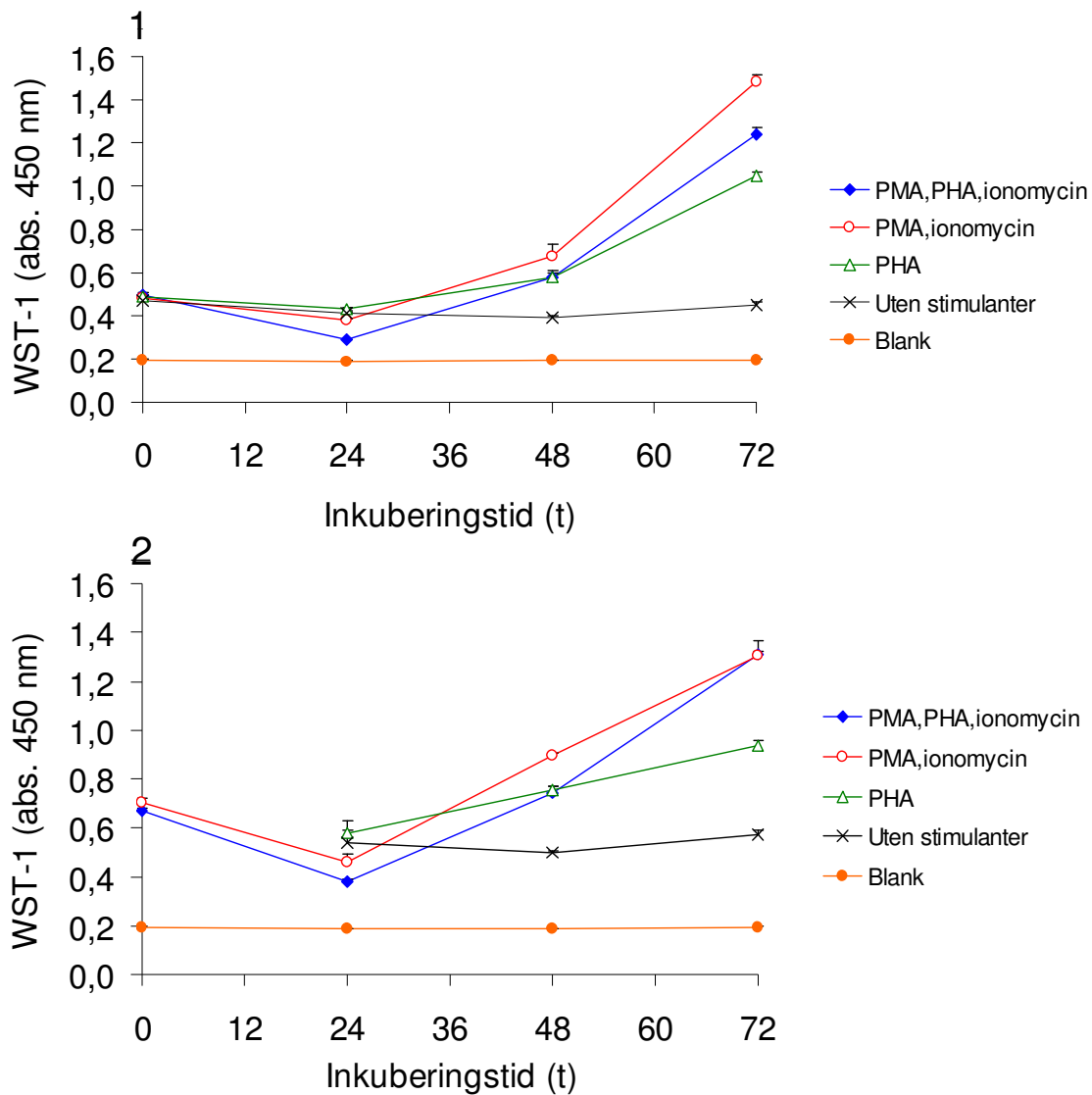


Figur 7. Utprøving av stimulanter og inkuberingstider ved aktivering av PBMC (mononukleære celler fra perifert blod). Metabolsk aktivitet (WST-1) ble målt som markør på celleaktiveringen. PBMC ble fortynnet til 800 000 celler/mL i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma. Aktivering med phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), phytohemagglutinin (PHA) og ionomycin i sluttkonsentrasjon: 50 ng/mL (PMA), 5 µg/mL (PHA) og 2,5 µg/mL (ionomycin) per brønn. Inkuberingstider: 0 – 24 – 48 – 72 timer. Etter endt inkubering ble cellene tilsatt WST-1 og inkubert videre i 4 timer. Gjennomsnitt ± std.avvik, n = 5.

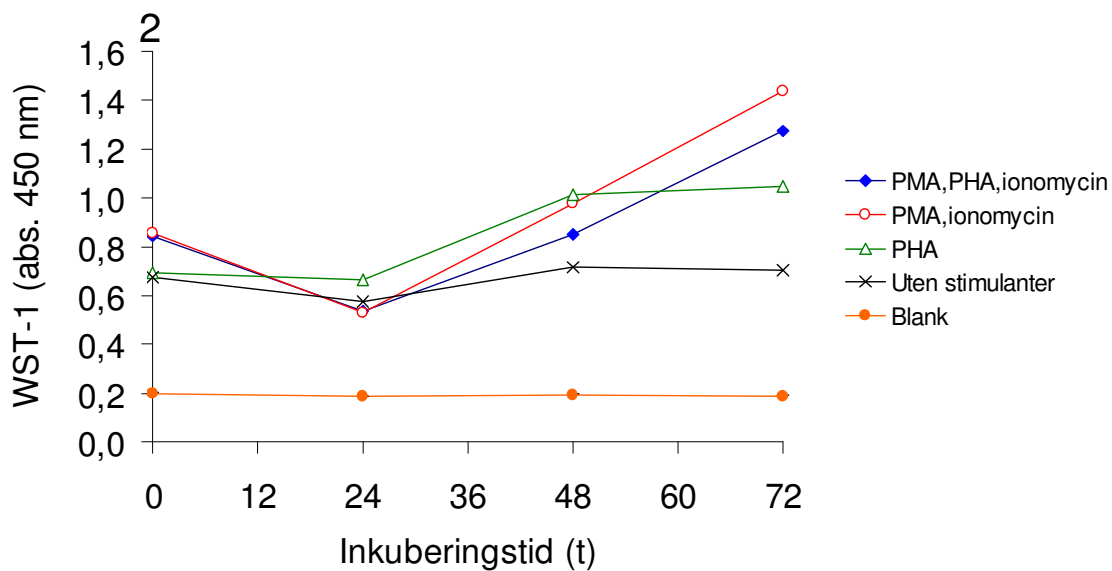
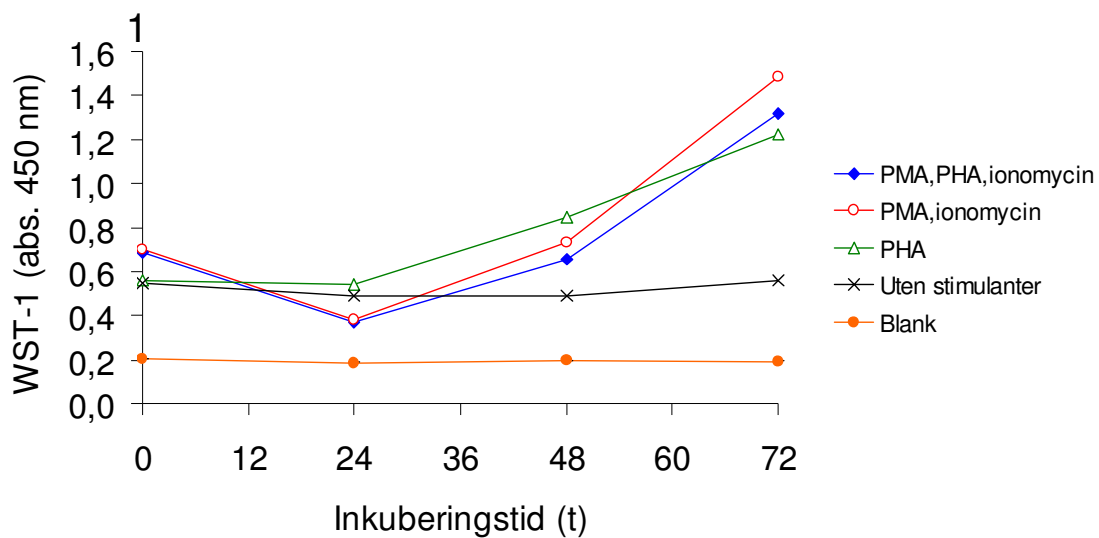
Utpøving av cellekonsentrasjoner for PBMC

I et forsøk med PBMC fra to friske personer (person D og person E), ble metabolsk aktivitet kvantifisert i aktiverte og ikke-aktiverte celler ved to ulike cellekonsentrasjoner: 400 000 celler/mL og 800 000 celler/mL. Aktiveringen ble utført med kombinasjoner av PHA, PMA og ionomycin, og cellene ble inkubert i 0, 24, 48 og 72 timer. Metabolsk aktivitet ble plottet mot inkuberingstid, og resultatene for person D er vist i figur 8 og for person E i figur 9. For både person D og person E ble det sett stigende metabolsk aktivitet i aktiverte celler fra 24 til 72 timer ved begge cellekonsentrasjonene. Samme mønster ble sett for begge personene, og høyest metabolsk aktivitet ble målt etter 72 timers inkubering der PBMC var aktivert med PMA og ionomycin. Grafene indikerte at det ikke ble oppnådd høyere metabolsk aktivitet ved 800 000 celler/mL sammenlignet med 400 000 celler/mL.

VK for målingene i forsøket med celler fra person D var median 3 % (0,5 % - 25 %), $n = 3$ per målepunkt. Kun to paralleller ble benyttet per målepunkt for person E og VK ble ikke beregnet.

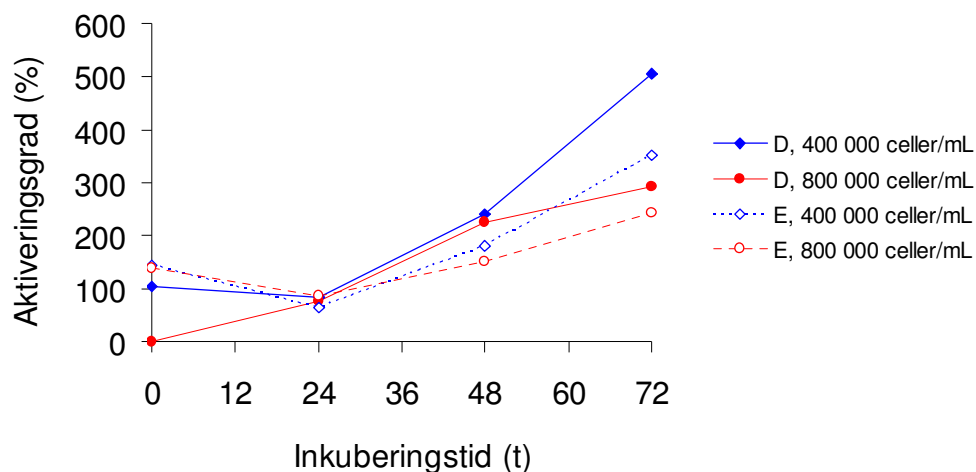


Figur 8. Utprøving av stimulanter, inkuberingstider og cellekonsentrasjoner ved aktivering av PBMC (mononukleære celler fra perifert blod), person D. Metabolsk aktivitet (WST-1) ble målt som markør på celleaktiveringen. PBMC ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 1) 400 000 celler/mL og 2) 800 000 celler/mL. PBMC ble aktivert med phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), phytohemagglutinin (PHA) og ionomycin i sluttkonsentrasjon: 50 ng/mL (PMA), 5,0 µg/mL (PHA) og 2,5 µg/mL (ionomycin) per brønn. Inkuberingstider: 0 – 24 – 48 – 72 timer. Etter endt inkubering ble cellene tilsatt WST-1 videre inkubert i 4 timer. Gjennomsnitt ± std.avvik, n = 3.



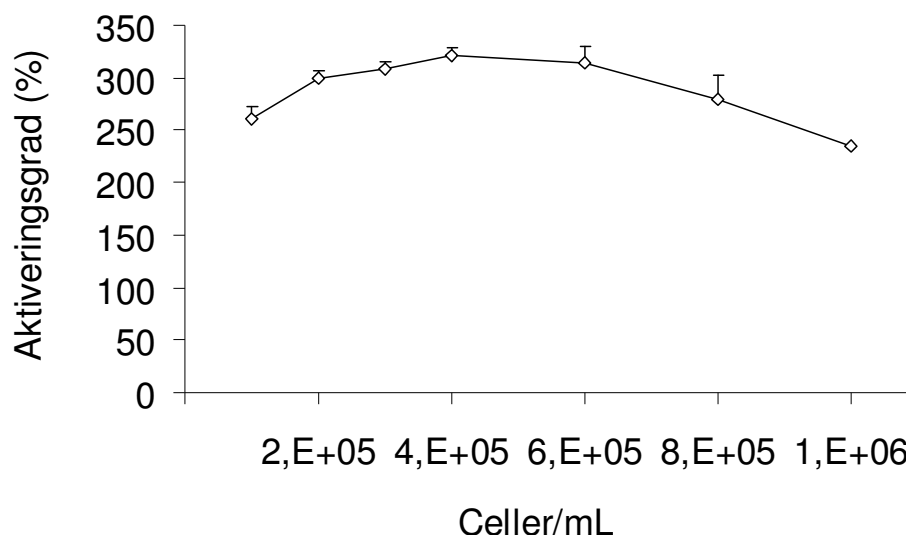
Figur 9. Utprøving av stimulanter, inkuberingstider og cellekonsentrasjoner ved aktivering av PBMC (mononukleære celler fra perifert blod), person E. Metabolsk aktivitet (WST-1) ble målt som markør på celleaktiveringen. PBMC ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 1) 400 000 celler/mL og 2) 800 000 celler/mL. PBMC ble aktivert med phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), phytohemagglutinin (PHA) og ionomycin i sluttkonsentrasjon: 50 ng/mL (PMA), 5,0 µg/mL (PHA) og 2,5 µg/mL (ionomycin) per brønn. Inkuberingstider: 0 – 24 – 48 – 72 timer. Etter endt inkubering ble cellene tilsatt WST-1 videre inkubert i 4 timer. Gjennomsnitt, n = 2.

Ved nærmere sammenlikning av de to cellekonsentrasjonene for person D og E, ble aktiveringsgraden beregnet (figur 10). Felles for de to personene var at det i PBMC aktivert med PMA og ionomycin ble observert høyest aktiveringsgrad ved 400 000 celler/mL, henholdsvis 506 % og 353 % for person D og E. Ved 800 000 celler/mL var aktiveringsgraden for person D på 292 % og for person E 243 %. Videre i metodeutviklingen for kvantifisering av metabolsk aktivitet i PBMC, ble PMA og ionomycin valgt som stimulanter og 72 timer som inkuberingstid. Det ble bestemt å undersøke cellekonsentrasjonene mer detaljert.



Figur 10. Utprøving av cellekonsentrasjoner ved aktivering av PBMC fra person D og person E. Metabolsk aktivitet i aktiverte vs. ikke-aktiverede celler (aktiveringsgrad) ble brukt som markør på celleaktiveringen. PBMC ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til henholdsvis 400 000 celler/mL og 800 000 celler/mL. Aktivering med phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og ionomycin i sluttkonsentrasjon: 50 ng/mL (PMA) og 2,5 µg/mL (ionomycin) per brønn. Inkuberingstider: 0 – 24 – 48 – 72 timer. Etter endt inkubering ble cellene tilsatt WST-1 og videre inkubert i 4 timer. Gjennomsnitt, n = 3 (person D), n = 2 (person E).

Med utgangspunkt i resultatet fra forrige forsøk hvor det ble observert høyest aktiveringsgrad ved 400 000 celler/mL, ble metabolsk aktivitet kvantifisert i et nytt forsøk med PBMC fra en frisk person, men ved flere cellekonsentrasjoner. PBMC ble aktivert med PMA og ionomycin og inkubert i 72 timer. Sluttkonsentrasjonene varierte fra 100 000 celler/mL til 1 000 000 celler/mL (100 000 – 200 000 – 300 000 – 400 000 – 600 000 – 800 000 – 1 000 000 celler/mL) per brønn. Aktiveringsgraden ble som i forrige forsøk funnet å være høyest ved 400 000 celler/mL. Ved denne cellekonsentrasjonen var aktiveringsgraden 322 % (figur 11). Det ble valgt å gå videre med 400 000 celler/ som cellekonsentrasjon for kvantifisering av metabolsk aktivitet i PBMC.



Figur 11. Uprøving av cellekonsentrasjoner ved aktivering av PBMC (mononukleære celler fra perifert blod). Metabolsk aktivitet i aktive vs. ikke-aktive celler (aktiveringsgrad) ble brukt som markør på celleaktivering. PBMC ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma og aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 µg/mL ionomycin. Inkuberingstid var 72 timer. Etter endt inkubering ble cellene tilsatt WST-1 og videre inkubert i 4 timer. Gjennomsnitt ± std.avvik, n = 3.

Forsøket hadde VK på median 3,8 % (0,6 % - 8,5 %), n = 3 per målepunkt.

5.5.2 IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører

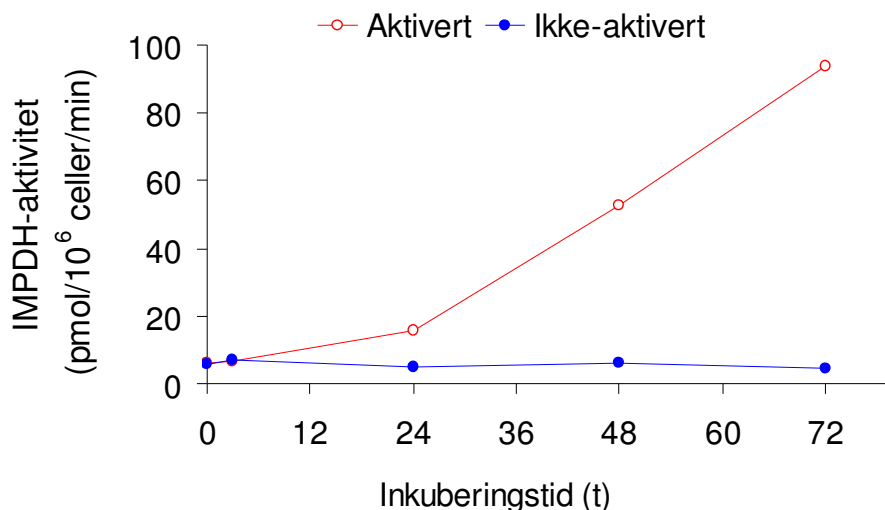
Fullblod aktivert med PHA, PMA og ionomycin

IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ble kvantifisert i PBMC isolert fra aktivert fullblod. Aktivert fullblod viste tegn til hemolyse under inkubering i 37 °C frem til 72 timer. Dette vanskeliggjorde gradientsentrifugering, isolering og telling av PBMC i etterkant og to tilsvarende forsøk med fullblod fra to friske personer ga ikke reproducerbare resultater.

CD4⁺ celler aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28

Siden kvantifisering av IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ikke ga reproducerbare resultater i aktivert fullblod med etterfølgende PBMC-isolering, ble det videre forsøkt med kvantifisering i CD4⁺ celler som ble aktivert ved tilsetning av kuler med antistoffer mot CD3 og CD28. Dette prinsippet har tidligere vist seg å fungere (51). CD4⁺ celler ble fortynnet i medium A tilsatt plasma fra klinisk prøve, til 800 000 celler/mL. IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ble kvantifisert etter inkubering i 0, 3, 24, 48 og 72 timer.

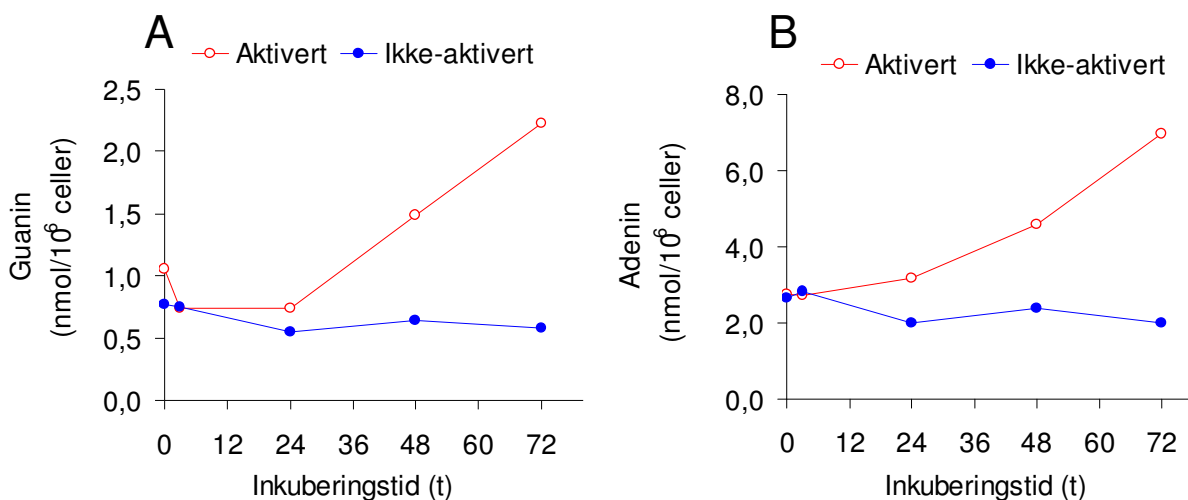
Aktiviteten til enzymet IMPDH ble beregnet som maksimal produksjonshastighet av XMP fra IMP (pmol XMP/10⁶ celler/min). IMPDH-aktivitet i aktiverte og ikke aktiverte CD4⁺ celler er vist i figur 12. Fra 24 til 72 timers inkubering ble det sett betydelig stigende IMPDH-aktivitet i aktiverte CD4⁺ celler i forhold til ikke-aktiverte celler. IMPDH-aktiviteten i ikke-aktiverte celler holdt seg på et lavere og tilnærmet konstant nivå. Etter 72 timers inkubering var IMPDH-aktiviteten 21 ganger høyere i aktiverte celler sammenliknet med ikke-aktiverte celler.



Figur 12. CD4⁺ celler fra en frisk person ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 800 000 celler/mL og aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28. Inkuberingstider: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. N = 1 per målepunkt. Inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH).

Nivåene av purinbaser ble kvantifisert ved LC-MS/MS etter at purinnukleotidene ble spaltet til frie purinbaser ved hydrolyse. Verdiene for hypoxantin kom under kvantifiseringsgrensen og er utelatt fra resultatene i dette forsøket.

Nivåene av guanin og adenin i aktiverte CD4⁺ celler (figur 13) steg med økende inkuberingstid og de høyeste nivåene for de to purinbasene ble sett etter 72 timers inkubering. Purinbasene i ikke-aktiverte celler holdt seg på tilnærmet uendrede nivåer. Nivået for guanin og adenin i aktiverte CD4⁺ celler var henholdsvis 4 og 3 ganger så høyt sammenliknet med ikke-aktiverte celler.



Figur 13. A) Guanin og B) adenin målt i aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler. CD4⁺ celler fra en frisk person ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 800 000 celler/mL og aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28. Inkuberingstider: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. N = 1 per målepunkt.

PBMC aktivert med PHA, PMA og ionomycin

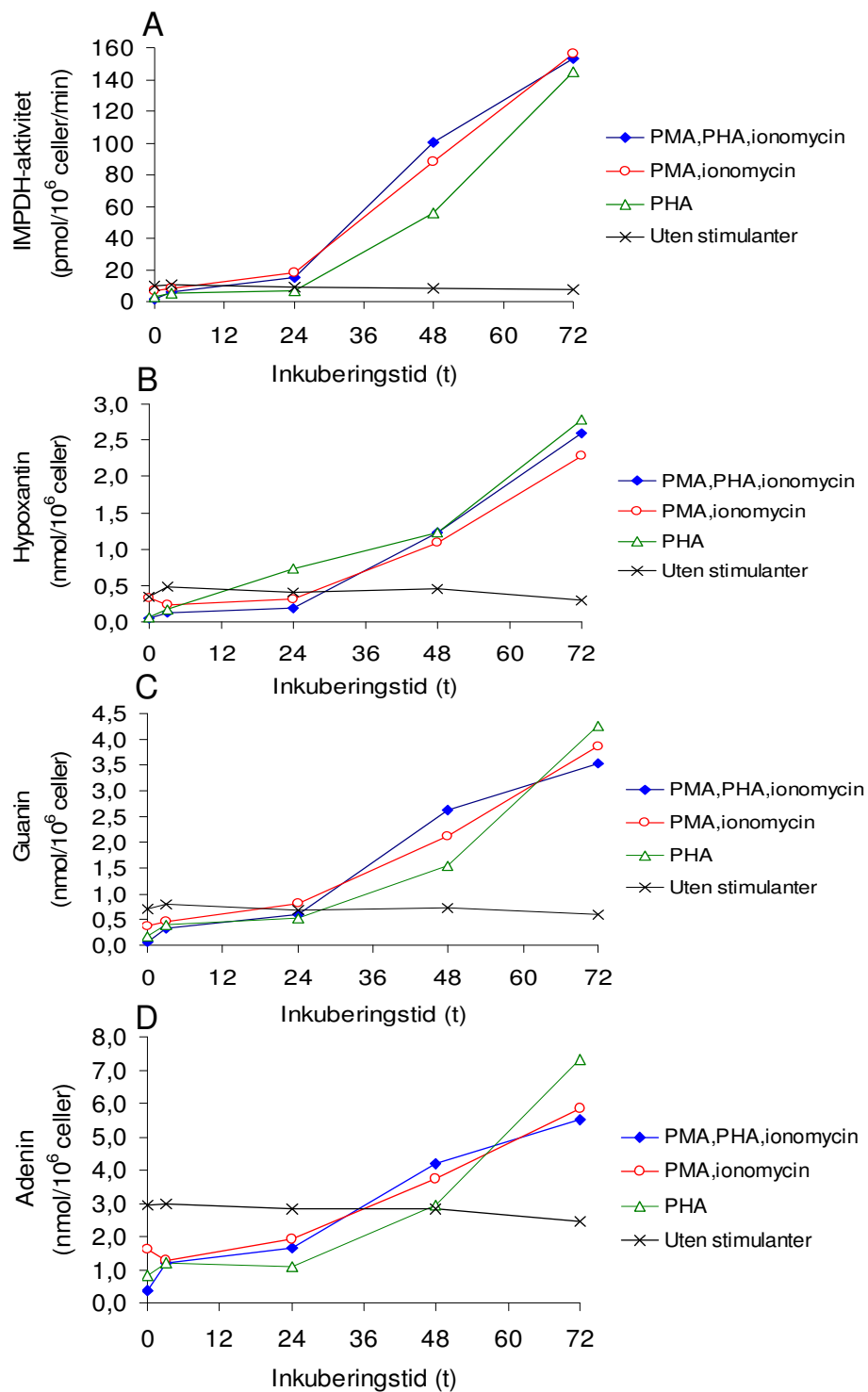
Utpøving av stimulanter og inkuberingstider

IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ble videre kvantifisert i PBMC. Cellene ble aktivert med PMA, PHA og ionomycin i ulike kombinasjoner og aktiverte og ikke-aktiverte celler ble inkubert i 0, 3, 24, 48 og 72 timer.

Betydelig økt IMPDH-aktivitet ble sett i aktiverte PBMC etter inkubering i 48 og 72 timer (figur 14). Resultatene indikerte at PMA og ionomycin medførte marginalt høyere IMPDH-aktivitet enn sammenliknet med PHA. Enzymaktiviteten i PMA og ionomycin-aktiverte PBMC var 21 ganger høyere sammenliknet med ikke-aktiverte celler ved 72 timer hvor høyest nivå ble observert. I de ikke-aktiverte cellene holdt aktiviteten seg på et lavere og tilnærmet konstant nivå.

Nivåene av hypoxantin, guanin og adenin i aktiverte PBMC steg i størst grad fra 24 til 72 timer. Se figur 14. Høyest nivå ble observert i PBMC aktivert med PHA, og dette var felles for de tre purinbasene. Men det ble ikke sett betydelige forskjeller i purinbasenivåene sammenliknet med de andre stimulantene (PMA og ionomycin) etter 72 timers inkubering. Nivåene av purinbasene i de ikke-aktiverte cellene holdt seg tilnærmet uendret gjennom inkuberingsintervallet. Ved 0 og 3 timer var det en tendens til at nivåene var lavere i aktiverte enn i ikke-aktiverte celler, noe som tydeligst kom frem for adenin. Vi valgte å gå videre med

PMA og ionomycin som stimulanter siden samme stimuleringsmedium da kunne benyttes til aktivering av PBMC og påfølgende kvantifisering av metabolsk aktivitet.



Figur 14. Stimulanter og inkuberingstid for A) IMPDH-aktivitet, B) hypoxantin, C) guanin, D) adenin i PBMC (mononukleære celler fra perifert blod).

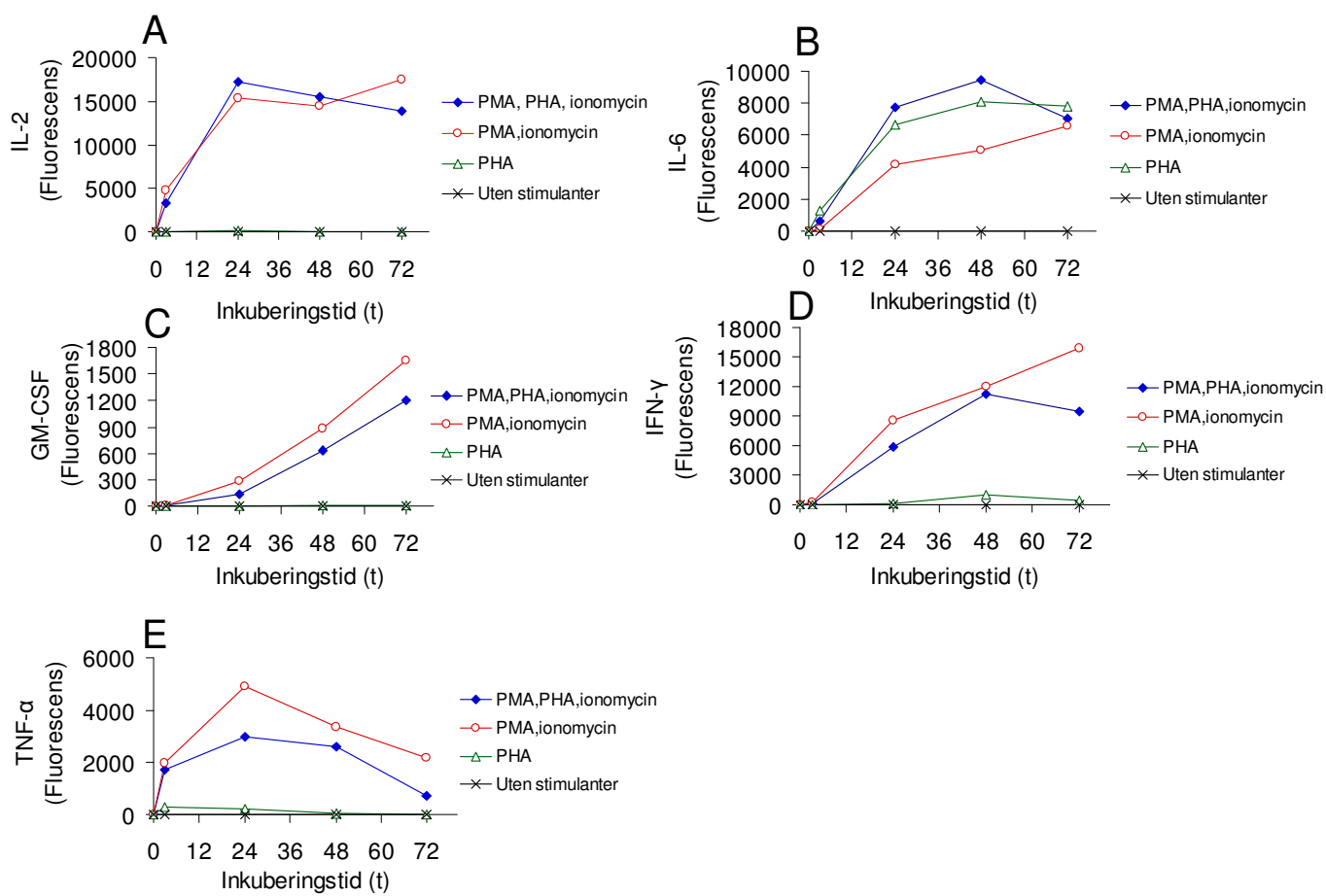
Figurtekst figur 14. PBMC fra en frisk person ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 800 000 celler/mL og aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), 5,0 µg/mL phytohemagglutinin (PHA) og 2,5 µg/mL ionomycin per rør. Inkuberingstider: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. N = 1 per målepunkt. Inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH).

5.5.3 Cytokiner som biomarkører

Supernatant fra henholdsvis aktivert fullblod, PBMC og CD4⁺ celler ble fortynnet 10 ganger og supernatant fra ikke-aktivert fullblod, PBMC og CD4⁺ celler ble fortynnet 2 ganger i medium B. Under metodeutviklingen ble fluorescens fra spesifikke fluorofor-koblede antistoffer betraktet som mål på utskillelse av IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α . Kvantifisering i fullblod, CD4⁺ celler og PBMC ble utført etter inkubering i 0, 3, 24, 48 og 72 timer.

Fullblod aktivert med PHA, PMA og ionomycin

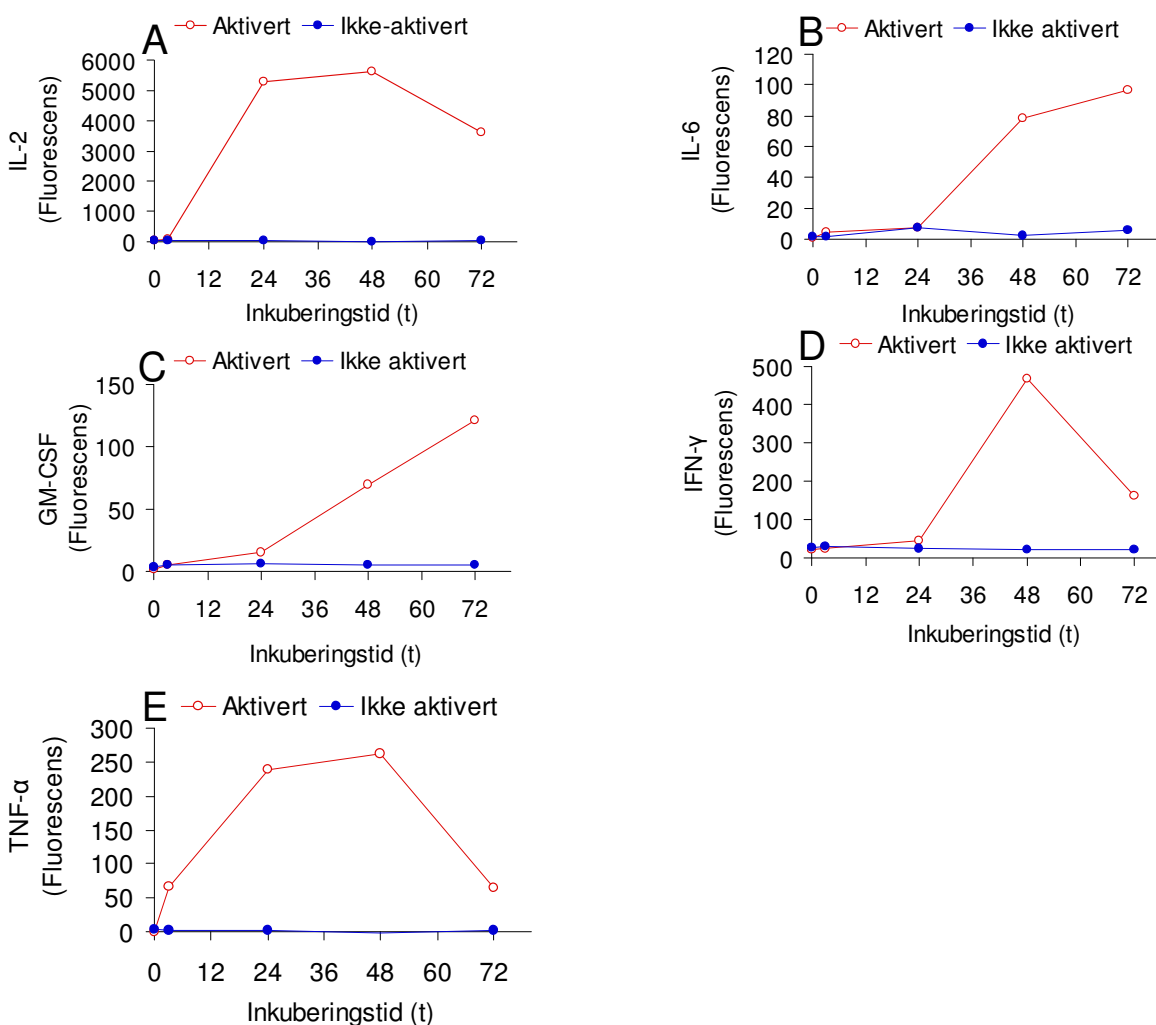
Den antistoff-spesifikke fluorescensen økte kraftig for alle cytokinene ved aktivering. Tidsforløpet for nivåendringene av de ulike cytokinene er vist i figur 15. Generelt ble det observert størst økning der fullblod var aktivert med PMA og ionomycin og inkubert 72 timer, unntatt IL-6, hvor aktivering med PHA også ga høy fluorescens. Nivået av TNF- α avtok etter 24 timers stimulering. Fluorescensen lå på et lavere og tilnærmet konstant nivå i fullblod som ikke var aktivert. Dette nivået tilsvarte bakgrunnsfluorescensen i blankt medium.



Figur 15. Utskillelse av cytokiner ved aktivering av fullblod med ulike stimulanter. Antistoff-spesifikk fluorescens ble brukt som mål på cytokinutskillelse i supernatant. A) Interleukin-2 (IL-2), B) Interleukin-6 (IL-6), C) granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF), D) Interferon- γ (IFN- γ), E) Tumor nekrose faktor- α (TNF- α). Fullblod ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), 5,0 μ g/mL phytohemagglutinin (PHA) og 2,5 μ g/mL ionomycin per rør. Inkuberingstider: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. Bakgrunn er trukket fra. Blod fra en frisk person. N = 1 per målepunkt.

CD4⁺ celler aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28

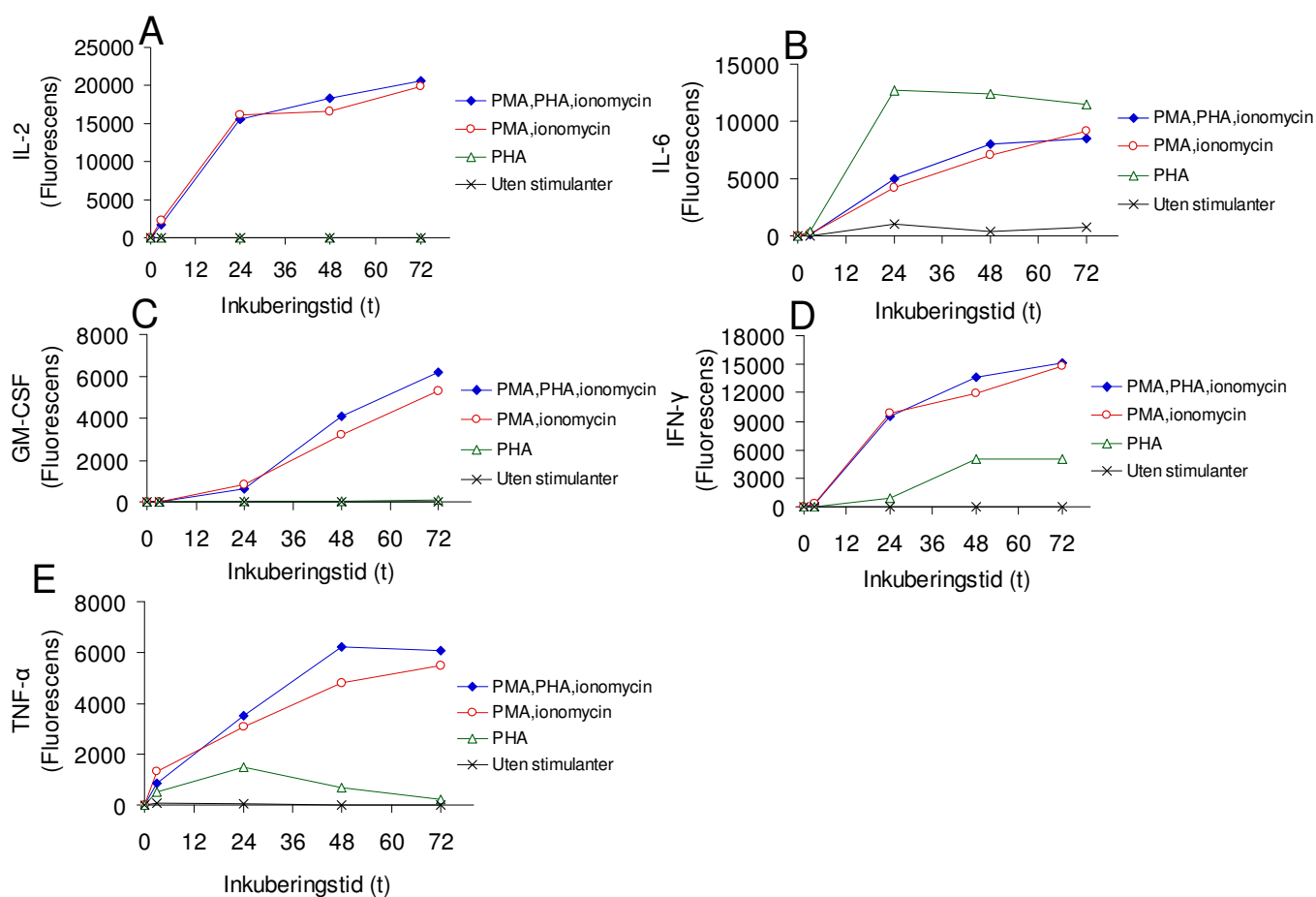
For alle cytokinene ble det sett betydelig økt antistoff-spesifikk fluorescens i aktiverte CD4⁺ celler etter 48 timers inkubering (figur 16). Fluorescensen i supernatant fra aktiverte CD4⁺ celler avtok for IL-2, IFN- γ og TNF- α fra 48 til 72 timer. Nivåene i supernatant fra ikke-aktiverte celler holdt seg på et tilnærmet konstant nivå som var marginalt høyere enn bakgrunnsfluorescensen.



Figur 16. Utskillelse av cytokiner ved aktivering av CD4⁺ celler. Antistoff-spesifikk fluorescens ble brukt som mål på cytokinutskillelse i supernatant. A) Interleukin-2 (IL-2), B) Interleukin-6 (IL-6), C) granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF), D) Interferon- γ (IFN- γ), E) Tumor nekrose faktor- α (TNF- α). CD4⁺ celler fra en frisk person ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma og aktivert med antistoffer mot CD3 og CD28. Inkuberingstider: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. Bakgrunn er trukket fra. N = 1 per målepunkt.

PBMC aktivert med PHA, PMA og ionomycin

For alle cytokinene steg den antistoff-spesifikke fluorescensen med økende inkuberingstid i aktiverte PBMC (figur 17). Høyest fluorescens ble observert ved 72 timers inkubering i PBMC aktivert med enten PMA+PHA+ionomycin eller PMA+ionomycin. Generelt sett for alle cytokinene, med unntak av IL-6, holdt fluorescensen seg på et lavere nivå da PBMC ble aktivert med PHA alene. I supernatant fra ikke-aktiverte celler var fluorescensen på nivå med bakgrunnen, unntatt for IL-6 hvor det tilsynelatende var et målbart nivå.



Figur 17. Utskillelse av cytokiner ved aktivering av PBMC (mononukleære celler fra perifert blod) med ulike stimulanter. Antistoff-spesifikk fluorescens ble brukt som mål på cytokinutskillelse i supernatant. A) Interleukin-2 (IL-2), B) Interleukin-6 (IL-6), C) Granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF), D) Interferon- γ (IFN- γ), E) Tumor nekrose faktor- α (TNF- α). PBMC fra en frisk person ble fortynnet i mediet RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma og aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), 5,0 μ g/mL phytohemagglutinin (PHA) og 2,5 μ g/mL ionomycin per rør. Inkuberingstider: 0 – 3 – 24 – 48 – 72 timer. Bakgrunn er trukket fra. N = 1 per målepunkt.

5.2 Effekter av immundempende legemidler på biomarkørene

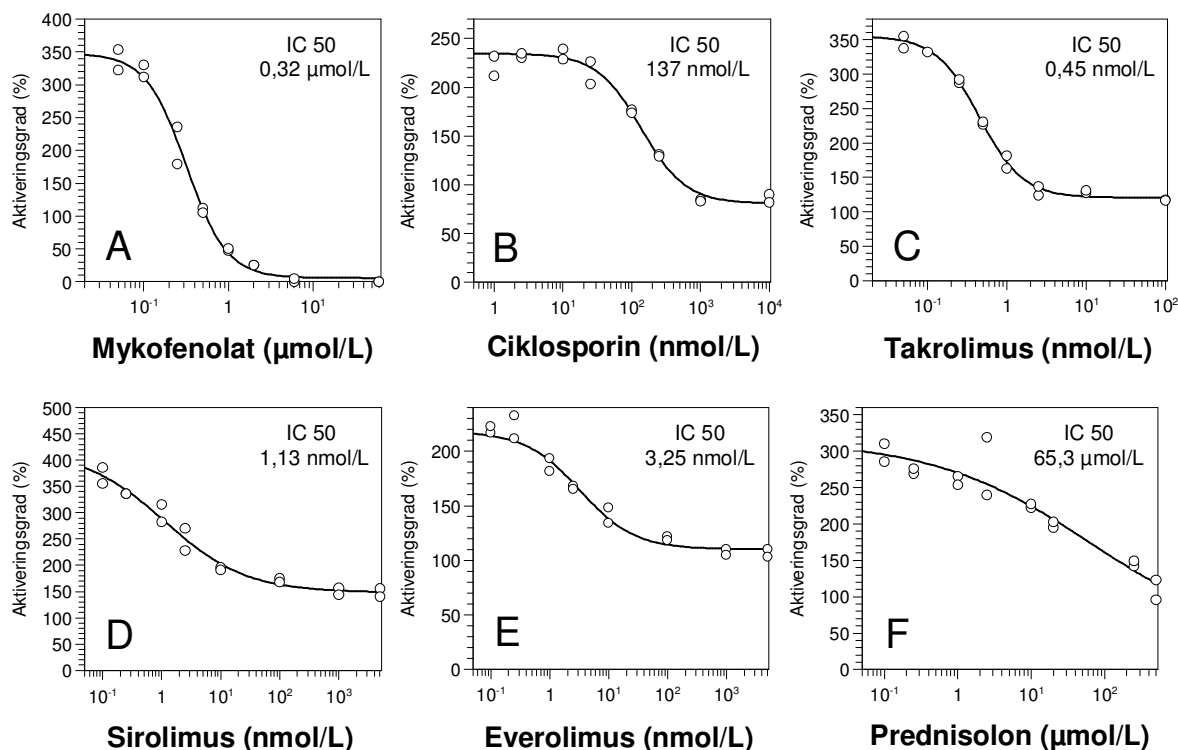
5.2.1 Metabolsk aktivitet (WST-1) som biomarkør

På grunn av at kvantifisering av metabolsk aktivitet er enklere og mindre tidkrevende enn kvantifisering av IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse, samt at forsøkene med PBMC viste stor forskjell i metabolsk aktivitet mellom aktiverte og ikke aktiverte celler, ble metabolsk aktivitet i PBMC valgt som markør for å undersøke konsentrasjonsavhengige effekter de immundempende legemidlene har på aktiveringsgraden til *ex vivo* aktiverte immunceller. Det ble antatt at metabolsk aktivitet målt ved hjelp av WST-1 kan fungere som en generell markør på immuncellers aktiveringsgrad (proliferasjon og levedyktighet). Da kan all immunsuppresjon fanges opp, uavhengig av legemidlenes spesifikke virkningsmekanisme, og responskurve for hvert enkelt legemiddel kan konstrueres.

For å teste immunaktiveringen mot takrolimus, CsA, MPA, prednisolon, everolimus, sirolimus, ble PBMC aktivert med PMA og ionomycin, for deretter å bli inkubert med hvert enkelt legemiddel i 72 timer. Tilpasning av legemidlenes konsentrasjonsområder ble gjort med den hensikt å lage responskurver av akseptabel kvalitet. I denne sammenheng ble to forsøk med PBMC fra to friske personer utført. Hver legemiddelkonsentrasjon ble testet i to paralleller.

For alle de immundempende legemidlene ble aktiveringsgraden nedsatt med økende legemiddelkonsentrasjon. Hemmingen hadde et non-lineært forløp der den flatet ut ved høye konsentrasjoner. Dette gjaldt ikke prednisolon siden det tilsynelatende ikke ble oppnådd høye nok konsentrasjoner til å produsere maksimal effekt av dette legemiddelet. Responskurvene ble beregnet ut ifra ni punkter: åtte ulike legemiddelkonsentrasjoner samt en måling uten legemiddeltilsetning. Konsentrasjonene ble ansett som tilfredsstillende tilpasset i forsøket hvor PBMC fra person A ble utprøvd. Basert på responskurvene for de seks legemidlene ble aktiveringsgraden (uten legemiddel) gjennomsnittlig beregnet til å være 315 %. Maksimal inhibering av aktiveringsgraden for de ulike legemidlene var: CsA 66 %, takrolimus 66 %, MPA 98 %, prednisolon 90 %, everolimus 49 % og sirolimus 65 %. MPA medførte svært lav aktiveringsgrad ved høyeste konsentrasjon. Aktiveringsgraden som ble estimert ved MPAs høyeste konsentrasjon, lå langt under aktiveringsgraden i ikke-aktivererte celler som tilsvarte

100 %. Responskurvene til person A er vist i figur 18. Det ble undersøkt at legemidlene i seg selv ikke bidro til absorbans ved 450 nm (resultat ikke vist). Metanol viste heller ikke betydelige tegn til å påvirke absorbansen i stimulerte celler, da det kun var marginale forskjeller mellom stimulerte PBMC som var tilsatt enten metanol og RPMI 1640 (resultater ikke vist).



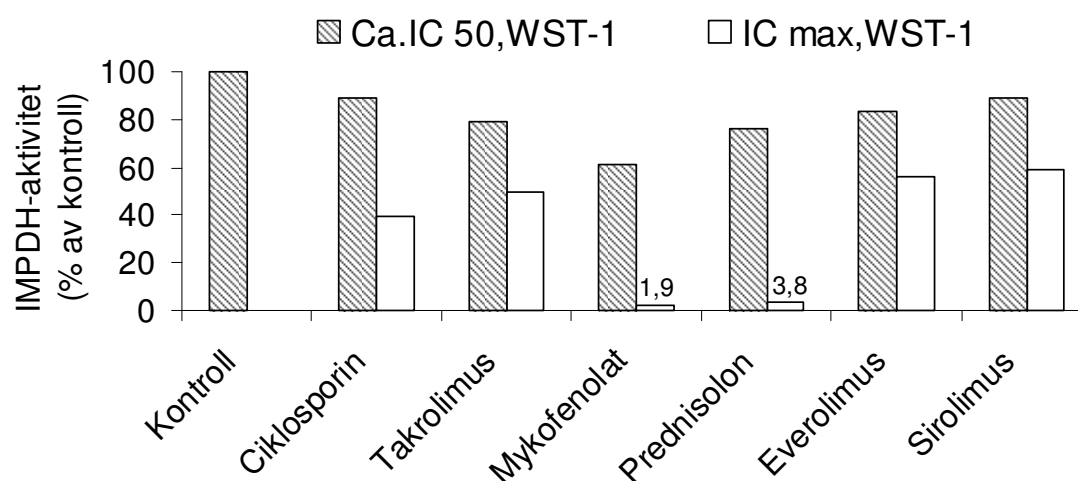
Figur 18. Immundempende legemidlers effekt på aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler i perifert blod). PBMC fra en frisk person ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 μg/mL ionomycin og inkubert med ulike konsentrasjoner av hvert enkelt immundempende legemiddel: A) Mykofenolat, B) Ciklosporin, C) Takrolimus, D) Sirolimus, E) Everolimus, F) Prednisolon. WST-1 ble tilsatt etter 72 timers inkubering og videre inkubert i 4 timer. Responskurver og IC₅₀-verdier ble beregnet ved hjelp av GraFit versjon 5 programvare. N = 2 per legemiddelkonsentrasjon.

5.2.2 IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører

Etter å ha tilpasset legemidlenes konsentrasjonsområder og laget legemiddelresponskurver med metabolsk aktivitet som biomarkør, ble påvirkningen de immundempende legemidlene hadde på IMPDH-aktiviteten og nivå av purinbaser i aktiverte PBMC (PMA, ionomycin) kvantifisert etter 72 timers inkubering. På bakgrunn av legemiddelresponskurvene fra forrige forsøk, ble to konsentrasjoner for hvert legemiddel valgt til utprøving i dette forsøket. PBMC

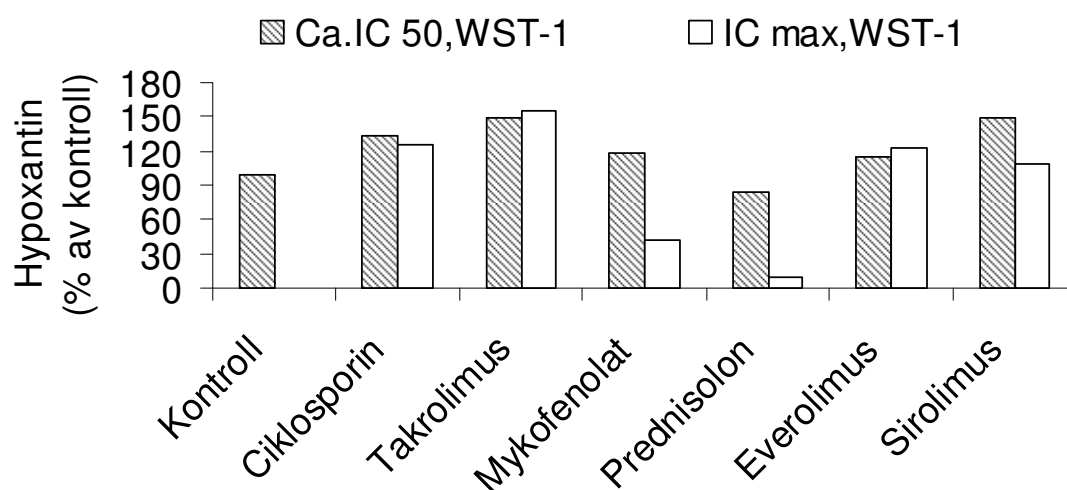
fra en frisk person ble aktivert og inkubert med konsentrasjonen som lå nærmest $IC_{50,WST-1}$, samt den legemiddelkonsentrasjonen som gav maksimal effekt på metabolsk aktivitet (dvs. den høyeste legemiddelkonsentrasjonen; $IC_{max,WST-1}$).

IMPDH-aktiviteten i aktiverte celler ble redusert ved både $IC_{50,WST-1}$ og $IC_{max,WST-1}$ for alle legemidlene, sammenliknet med aktiviteten i celler som ble inkubert uten legemiddel. Størst reduksjon ble observert for MPA og prednisolon ved de høyeste konsentrasjonene (60 $\mu\text{mol/L}$ og 2000 $\mu\text{mol/L}$). Her var reduksjonen henholdsvis 98 % og 96 % i forhold til kontrollen (figur 19).



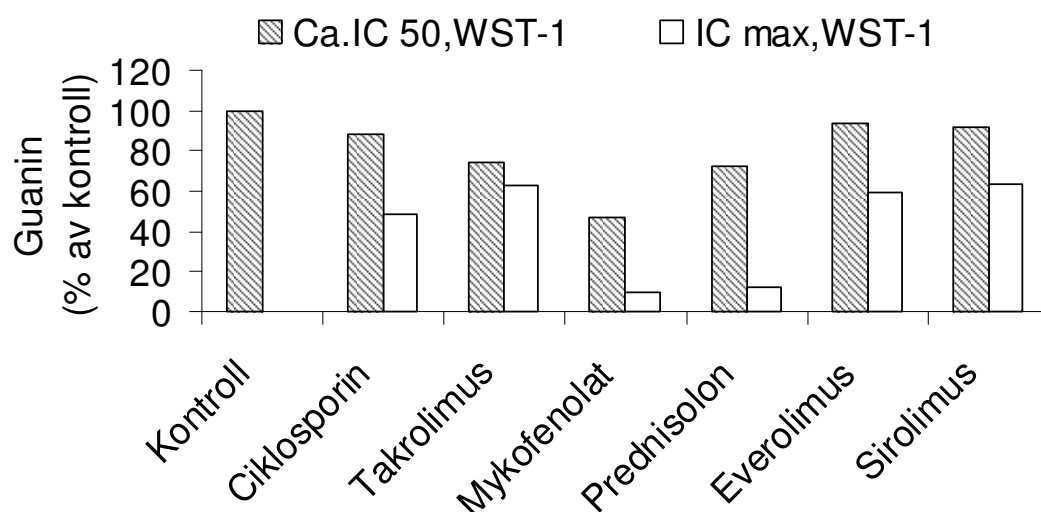
Figur 19. Immundempende legemidlers effekt på IMPDH-aktivitet i aktiverte PBMC (mononukleære celler fra perifert blod). PBMC fra en frisk person ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ionomycin og inkubert med hvert enkelt immundempende legemiddel: mykofenolat, ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus og prednisolon, i 72 timer. IMPDH-aktivitet ble kvantifisert ved væskechromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) og respons ble beregnet i % av kontroll som var tilsatt metanol. N = 1 per legemiddelkonsentrasjon. Inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH).

Nivået av hypoxantin økte tilsynelatende noe i aktiverte PBMC som var tilsatt CNI (25-55 %). En lignende tendens ble observert for mTOR-hemmerne, og ved middels konsentrasjon av MPA. Imidlertid ble nivået av hypoxantin redusert da MPA og prednisolon var ved høyeste konsentrasjon (60 $\mu\text{mol/L}$ og 2000 $\mu\text{mol/L}$). Reduksjonen var på henholdsvis 59 % og 90 % i forhold til kontrollen (figur 20).



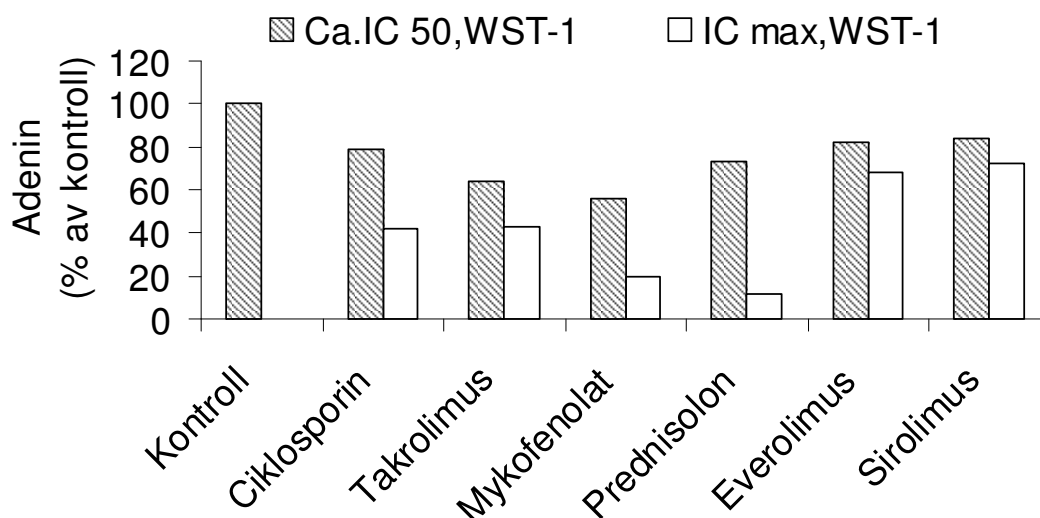
Figur 20. Immundepende legemidlers effekt på nivå av hypoxantin i aktiverte PBMC (mononukleære celler fra perifert blod).). PBMC fra en frisk person ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 µg/mL ionomycin og inkubert med hvert enkelt immundepende legemiddel: mykofenolat, ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus og prednisolon i 72 timer. Hypoxantin ble kvantifisert ved væskrokromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) og respons beregnet i % av kontroll som var tilsatt metanol. N = 1 per legemiddelkonsentrasjon.

Det ble observert reduserte nivåer av guanin (figur 21) og adenin (figur 22) ved både IC_{50, WST-1} og IC_{max, WST-1} for alle de immundepende legemidlene. Nivåene av disse to purinbasene utviste samvariasjon. Størst reduksjon ble sett for MPA og prednisolon ved de høyeste konsentrasjonene (60 µmol/L og 2000 µmol/L). Her var reduksjonen henholdsvis 91 % og 87 % for guanin, og 80 % og 89 % for adenin, i forhold til kontrollen.



Figur 21. Immundepende legemidlers effekt på nivå av guanin i aktiverte PBMC (mononukleære celler fra perifert blod).

Figurtekst figur 21. PBMC fra en frisk person ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 µg/mL ionomycin og inkubert med hvert enkelt immundempende legemiddel: mykofenolat, ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus og prednisolon, i 72 timer. Guanin ble kvantifisert ved væskrokromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) og respons beregnet i % av kontroll som var tilsatt metanol. N = 1 per legemiddelkonsentrasjon.



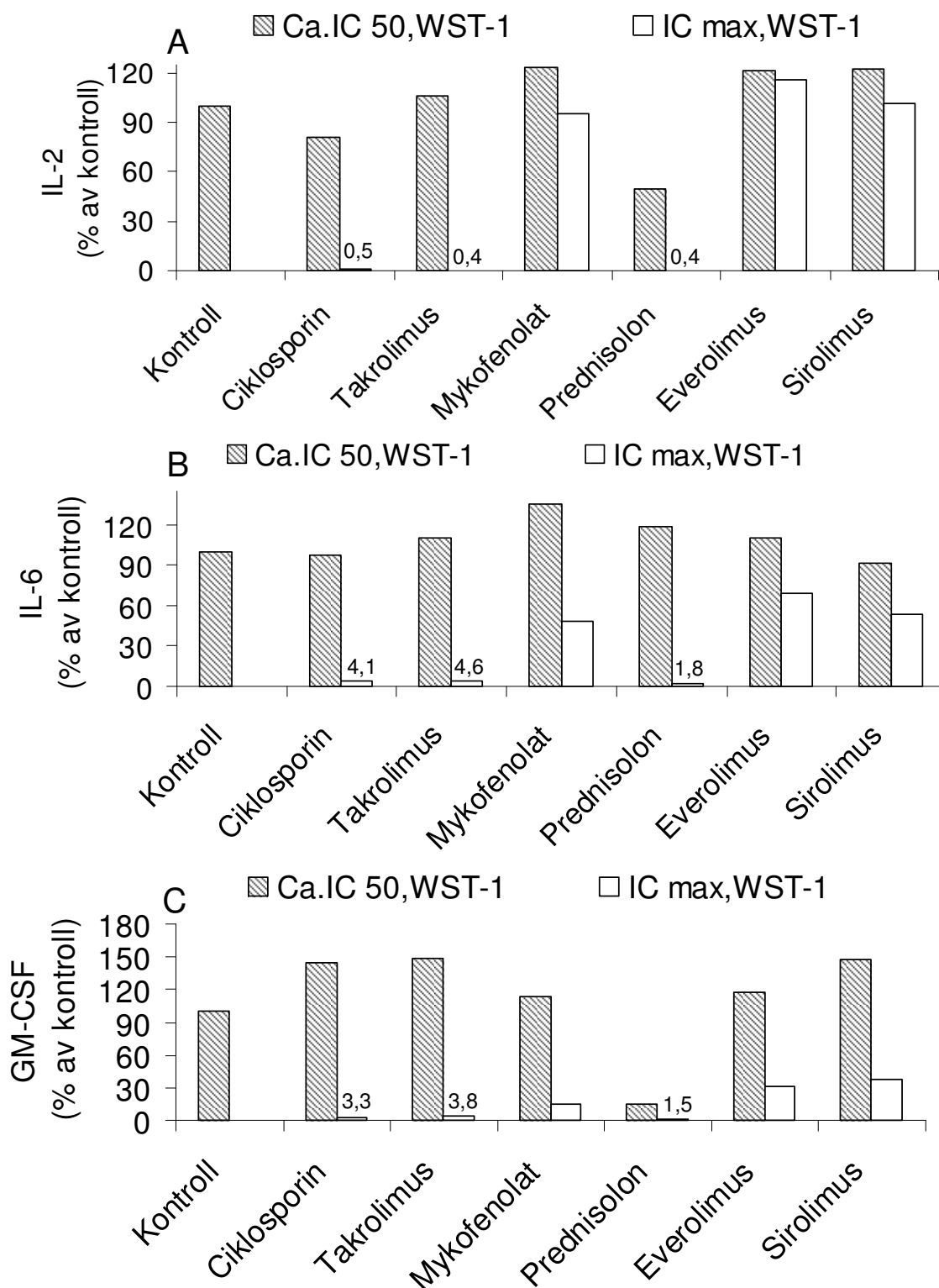
Figur 22. Immundempende legemidlers effekt på nivå av adenin i aktiverte PBMC (mononukleære celler i perifert blod). PBMC fra en frisk person ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 µg/mL ionomycin og inkubert med hvert enkelt immundempende legemiddel: mykofenolat, ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus og prednisolon i 72 timer. Adenin ble kvantifisert ved væskrokromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) og respons beregnet i % av kontroll som var tilsatt metanol. N = 1 per legemiddelkonsentrasjon.

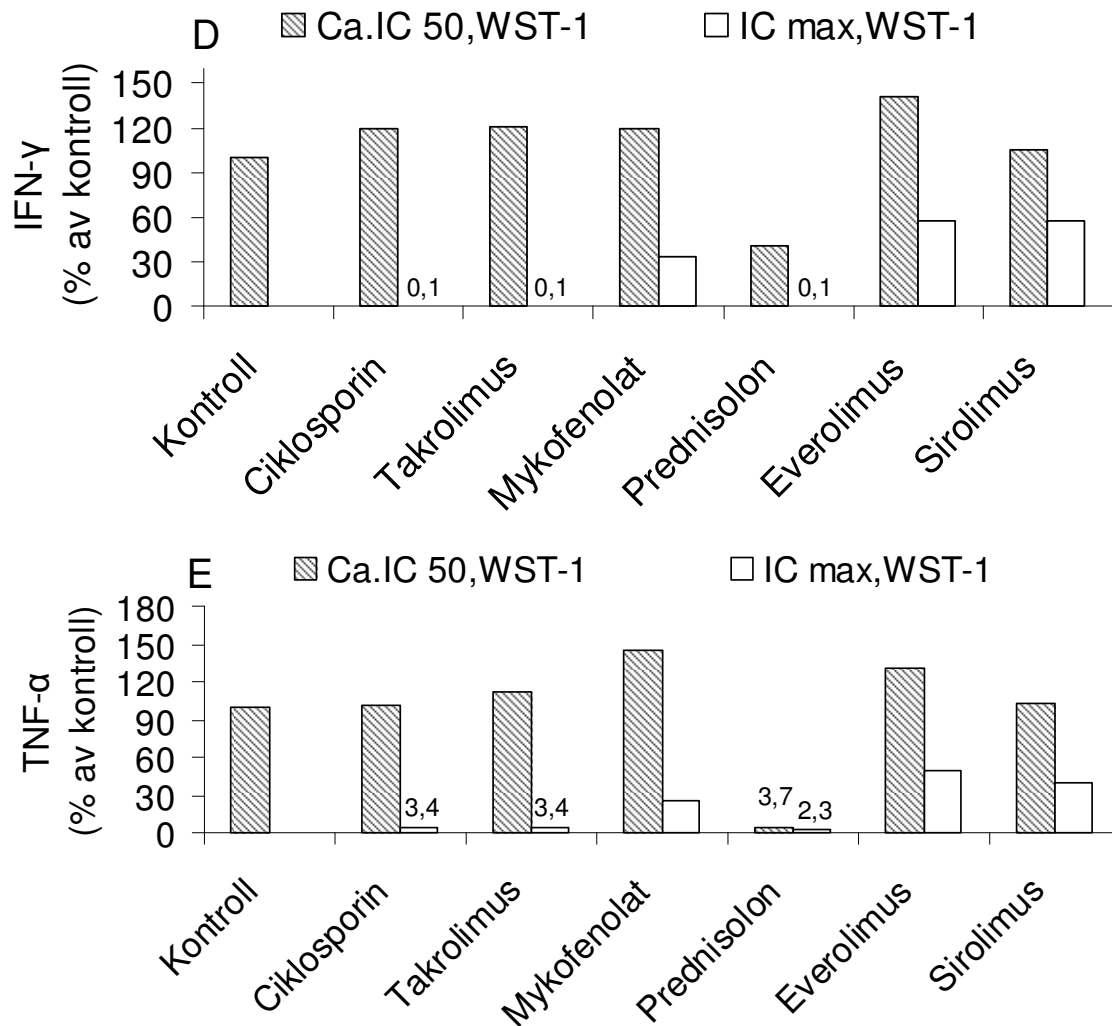
5.2.3 Cytokiner som biomarkører

Effekten de immundempende legemidlene hadde på cytokinutskillelse ble kvantifisert i fullblod og PBMC aktivert med PMA og ionomycin. Heparin-blod og PBMC ble tilsatt stimulanter og legemiddel, og så inkubert i 72 timer. Legemiddelkonsentrasjon nærmest $IC_{50, WST-1}$ samt $IC_{max, WST-1}$ ble brukt for hvert legemiddel. I kontrollen ble det ikke tilsatt legemiddel, men tilsvarende mengde metanol som i legemiddelløsningene. Supernatant fra prøvene ble fortynnet 20 ganger i medium B før analyse av cytokiner.

Det ble observert tilsvarende resultater for cytokinutskillelse i PBMC og fullblod. Resultater fra forsøket med fullblod er vist i figur 23. Ingen tydelige systematiske endringer ble observert for IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN-γ og TNF-α ved IC_{50} -konsentrasjonene. Derimot ble det observert en kraftig reduksjon av alle fem cytokinene der CsA, prednisolon og takrolimus

var tilsatt ved de høyeste konsentrasjonene (1000 nmol/L, 2000 μ mol/L, 100 nmol/L). Reduksjonene var i området 95 % - 100 % sammenliknet med kontrollen. IL-2 ble tilsynelatende lite påvirket av MPA og mTOR-hemmerene. GM-CSF, IFN- γ , TNF- α og IL-6 ble redusert ved de høyeste konsentrasjonene av alle legemidlene.





Figur 23. Immundempende legemidlers effekt på nivå av cytokinutskillelse i aktivert fullblod. Antistoffspesifikk fluorescens ble brukt som mål på cytokinutskillelse i supernatant. Fullblod fra en frisk person ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og 2,5 μ g/mL ionomycin og inkubert med hvert enkelt immundempende legemiddel: mykofenolat, ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus og prednisolon, i 72 timer. Etter inkubering ble cytokinene: A) Interleukin-2 (IL-2), B) Interleukin-6 (IL-6), C) Granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF), D) Interferon- γ (IFN- γ), E) Tumor nekrose faktor- α (TNF- α) kvantifisert. Respons ble beregnet i % av kontroll som var tilsatt metanol. N = 1 per legemiddelkonsentrasjon.

5.3 Etablerte betingelser for ex vivo immunaktivering

Som resultat fra metodeutviklingen ble betingelser for *ex vivo* immunaktivering med etterfølgende kvantifisering av biomarkørene metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse etablert. Cellemateriale, stimuleringsprinsipp i form av stimuleringsmedier og ulike cellekonsentrasjoner ble valgt med hensyn til kvantifiseringen av hver enkelt biomarkør. *Ex vivo* immunaktiveringsmetoden som ble utviklet ble benyttet til analyse av biomarkører i blodprøvene fra de nyretransplanterte pasientene som var inkludert i pilotstudien.

5.3.1 Kvantifisering av metabolsk aktivitet (WST-1)

Det ble valgt å kvantifisere metabolsk aktivitet i PBMC. Heparin-plasma fra klinisk prøve ble valgt som tilsetning i medium A. Isolerte PBMC ble fortynnet til 400 000 celler/mL og aktivert med PMA og ionomycin i sluttkonsentrasjon per brønn på henholdsvis 50 ng/mL og 2,5 µg/mL. Kvantifiseringen ble utført etter en inkuberingstid på 72 timer med etterfølgende 4 timers inkubering for WST-1. Absorbans ble lest av ved 450 nm.

5.3.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser

Det ble valgt å kvantifisere IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser i isolerte PBMC. Heparin-plasma fra klinisk prøve ble valgt som tilsetning i medium A. Isolerte PBMC ble fortynnet til 800 000 celler/mL og aktivert med PMA og ionomycin i sluttkonsentrasjon per rør på henholdsvis 50 ng/mL og 2,5 µg/mL. Kvantifiseringen ble utført etter en inkuberingstid på 72 timer.

5.3.3 Nivå av cytokinutskillelse

Videre ble det valgt å kvantifisere nivå av cytokinutskillelse i supernatant fra både aktivert fullblod og aktiverte PBMC. Fullblod og PBMC ble aktivert med PMA og ionomycin i sluttkonsentrasjon per rør på henholdsvis 50 ng/mL og 2,5 µg/mL. Kvantifiseringen ble utført etter inkubering i 72 timer, samt etter 3 timer.

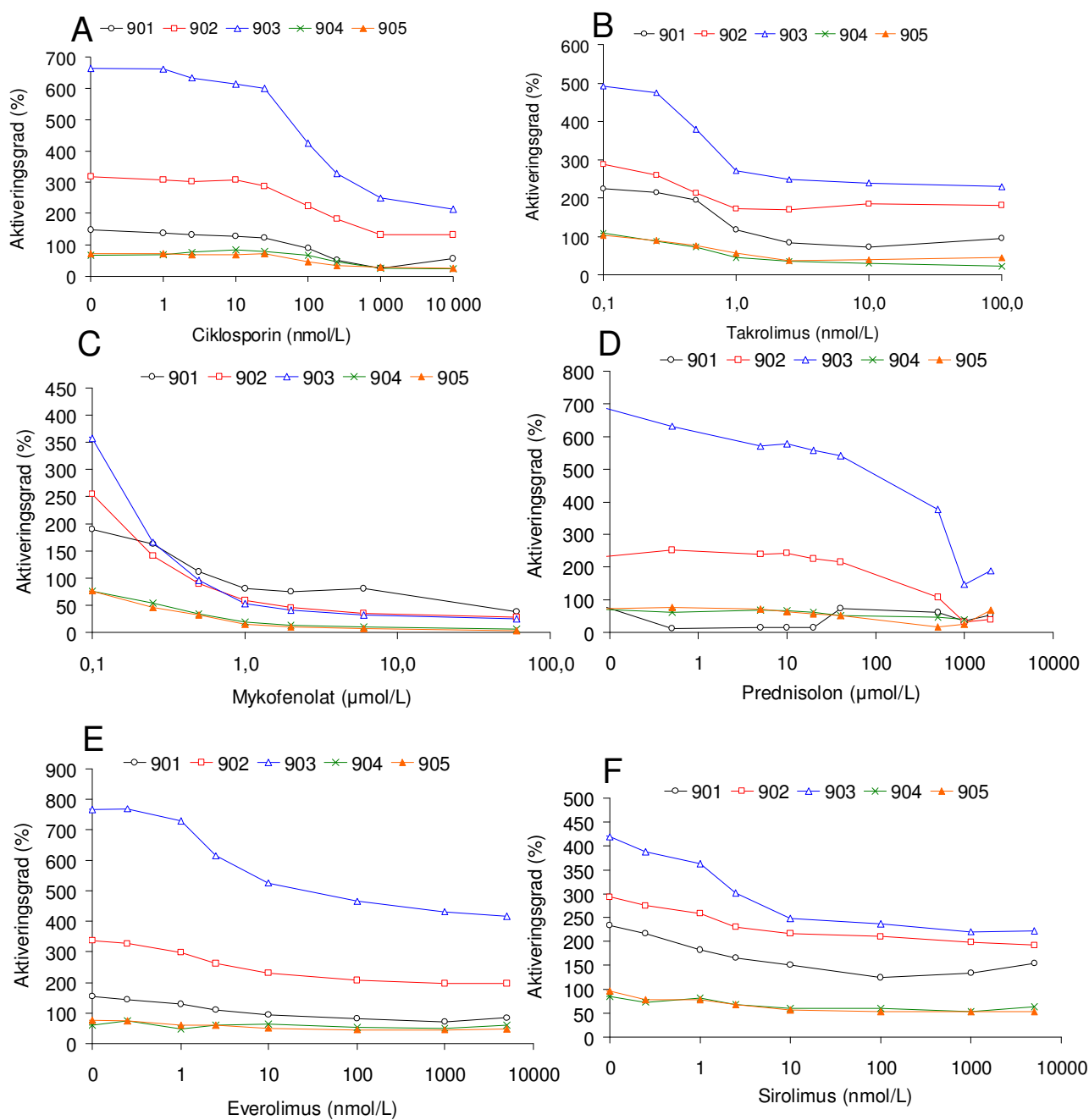
5.4 Pilotstudie

Fem pasienter ble inkludert i pilotstudien i løpet av tiden mastergraden ble utført. Av disse var tre menn og to kvinner i alderen 20-67 år. Alle mottok nyre fra levende giver. Prøver ble tatt 1-2 dager før transplantasjon, og ved 6-8 dager og 5-7 uker etter transplantasjon. Etter transplantasjon ble det tatt prøver ved t_0 og $t_{1,5}$ morgenen. Variasjonene i dagene det ble tatt prøver skyldtes i hovedsak praktiske årsaker, som pasientens innkomstdag ved Rikshospitalet før transplantasjon, transplantasjonstidspunkt og inkuberingstid for *ex vivo* immunaktiveringsmetoden som ble fulgt. Tidspunktene for prøvetaking vil videre i oppgaven bli referert i henhold til studieprotokollen: 0-4 dager før transplantasjon (Pre-Tx_{0-4 dager}), 6-9 dager etter transplantasjon (Post-Tx_{6-9 dager}) og 5-7 uker etter transplantasjon (Post-Tx_{5-7 uker}). Det ble samlet prøver fra alle fem pasientene ved alle tidspunktene før og etter transplantasjon.

5.4.1 Metabolsk aktivitet (WST-1) i *ex vivo*-aktiverte PBMC

0-4 dager før transplantasjon

Før transplantasjon ble responskurver konstruert for CsA, takrolimus, MPA, everolimus og sirolimus. Responskurvene til prednisolon var av dårlig kvalitet, og de ble utelatt fra videre beregninger. Det ble brukt svært høye konsentrasjoner av prednisolon, men likevel ble det tilsynelatende ikke oppnådd maksimal inhibering av metabolsk aktivitet, og kurveprofilene så ut til å være preget av usystematiske forløp i enkelte tilfeller. Det ble foretatt en måling per legemiddelkonsentrasjon. Responskurvene til de fem pasientene som ble inkludert i studien er vist i figur 24.



Figur 24. Immundempende legemidlers effekt på aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler i perifert blod) før nyretransplantasjon. PBMC ble isolert fra fem pasienter før nyretransplantasjon. Aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat og 2,5 μg/mL ionomycin og inkubert med ulike konsentrasjoner av hvert enkelt immundempende legemiddel: A) Ciklosporin, B) Takrolimus, C) Prednisolon, D) Mykofenolat, E) Everolimus, F) Sirolimus. WST-1 ble tilsatt etter 72 timers inkubering og videre inkubert i 4 timer. Responskurvene er basert på observerte målinger. I tillegg ble kurver og responsvariabler estimert ved nonlinear regresjon (GraFit versjon 5, ikke vist i figur). N = 1 per legemiddelkonsentrasjon.

Aktiveringsgrad ble beregnet ved direkte absorpsjonsmåling i aktiverte og ikke-aktiverte PBMC som ikke var tilsatt metanol. Aktiveringsgraden ble målt til median 199 %, men varierte mellom 66 % og 548 %.

For å beskrive hvordan *ex vivo*-immunaktiveringen ble påvirket av de immundempende legemidlene før transplantasjon, ble ulike variabler beregnet og tatt i betraktning. IC₅₀, maksimal inhibering (%) og minimumsnivå (%) ble estimert ut ifra den nonlineære regresjonsanalysen av responsmålingene. AUC_r ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden. I tabell C er de ulike responsvariablene oppsummert for de fem pasientene.

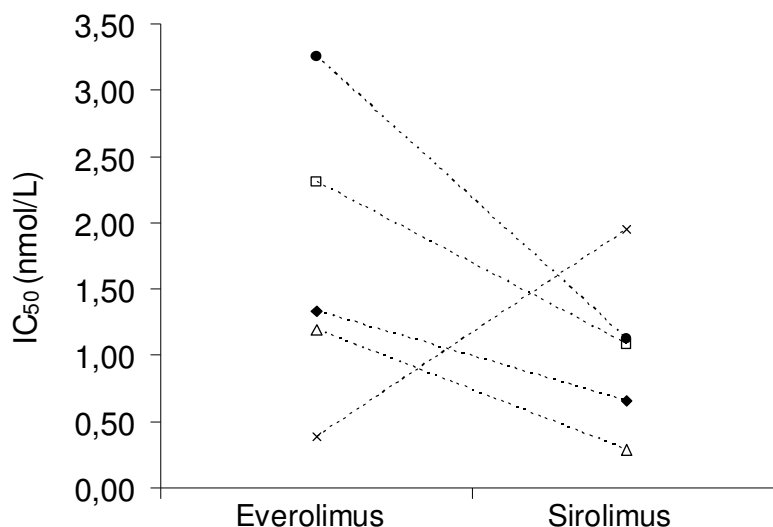
Tabell C. Variabler som beskriver legemiddelrespons på *ex vivo* immunaktivering

	IC ₅₀ (kons.)	Maksimal inhibering (%)	Minimums- nivå (%)	AUC _r (%*kons)
Ciklosporin (n = 5)	99,0 (91,9-224,8)	67,2 (58,9-70,7)	39,9 (22,9-215)	4,20×10 ⁵ (2,58×10 ⁵ -2,40×10 ⁶)
Takrolimus (n = 5)	0,64 (0,36-0,71)	58,0 (39,5-71,3)	83,0 (27,8-240)	8,47×10 ³ (2,73×10 ³ -2,37×10 ⁴)
Mykofenolat (n = 5)	0,29 (0,20-0,36)	89,2 (74,5-93,6)	35,7 (5,4-55,0)	1,89×10 ³ (3,55×10 ² -3,73×10 ³)
Everolimus (n = 5)	1,33 (0,39-3,25)	43,0 (35,1-55,3)	75,7 (44,9-432)	3,81×10 ⁵ (2,26×10 ⁵ -2,15×10 ⁶)
Sirolimus (n = 5)	1,08 (0,29-1,95)	49,5 (30,9-51,8)	137 (51,8-220)	7,08×10 ⁵ (2,63×10 ⁵ -1,11×10 ⁶)

Målingene ble utført i PBMC fra fem pasienter 1-2 dager før nyretransplantasjon. IC₅₀ (ciklosporin nmol/L, takrolimus nmol/L, mykofenolat µmol/L, everolimus nmol/L, sirolimus nmol/L), maksimum inhibering (%) og minimumsnivå (%) ble estimert for hvert legemiddel ved nonlineær regresjonsanalyse (4 parameters likning GraFit versjon 5). Trapesmetoden ble benyttet til beregning av AUC_r (areal under responskurve, %*kons) basert på faktiske målinger. Median (min-maks).

AUC_r og minimumsnivå fra responskurvene for CsA, takrolimus, MPA og everolimus viste 8,5-11 ganger forskjell mellom høyeste og laveste pasientmåling. Relative standardavvik for disse variablene hos de fem pasientene var i området 70 til 100 %. Variasjonen i AUC_r og minimumsnivå for sirolimus var noe lavere i forhold til de andre legemidlene med 4 ganger forskjell mellom høyeste og laveste og relative standardavvik på ca. 60 %.

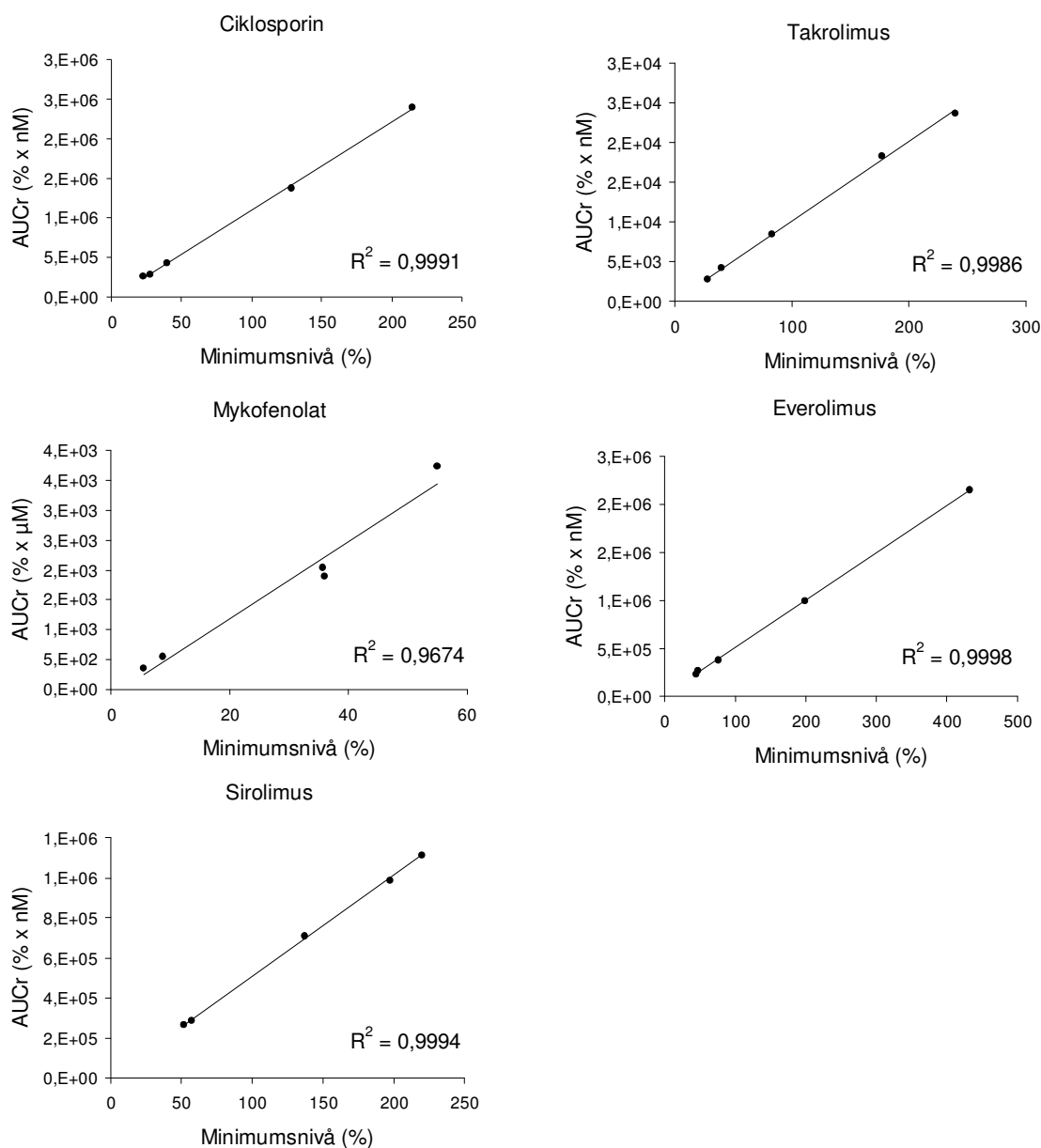
Maksimum inhibering og IC₅₀ varierte i mindre grad mellom pasientene sammenlignet med AUC_r og minimumsnivå. Relative standardavvik for maksimum inhibering var i området 8,0 til 23 %. For IC₅₀ var de relative standardavvikene 46 % (CsA), 23 % (takrolimus) og 24 % (MPA). IC₅₀ varierte i større grad mellom pasientene for sirolimus og everolimus som hadde relative standardavvik på henholdsvis 61 % og 65 %. Fire av de fem pasientene hadde lavere IC₅₀ for sirolimus sammenlignet med everolimus (figur 25).



Figur 25. IC₅₀-verdier for everolimus og sirolimus hos fem pasienter før nyretransplantasjon. PBMC (mononukleære celler fra perifert blod) ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat og 2,5 µg/mL ionomycin og inkubert med ulike konsentrasjoner av everolimus og sirolimus. WST-1 ble tilsatt etter 72 timers inkubering og videre inkubert i 4 timer. IC₅₀-verdier ble beregnet ved hjelp av GraFit versjon 5 programvare.

Linearitet mellom AUC_r og minimumsnivå

AUC_r ble plottet mot minimumsnivå for CsA, takrolimus, MPA, everolimus og sirolimus (figur 26). Det ble observert at AUC_r steg tilnærmet lineært med økende minimumsnivå. Basert på lineær regresjon ble det beregnet R^2 -verdier for hvert legemiddel: CsA 0,9991 %, takrolimus 0,9986 %, MPA 0,9674 %, everolimus 0,9998 % og sirolimus 0,9994 %.

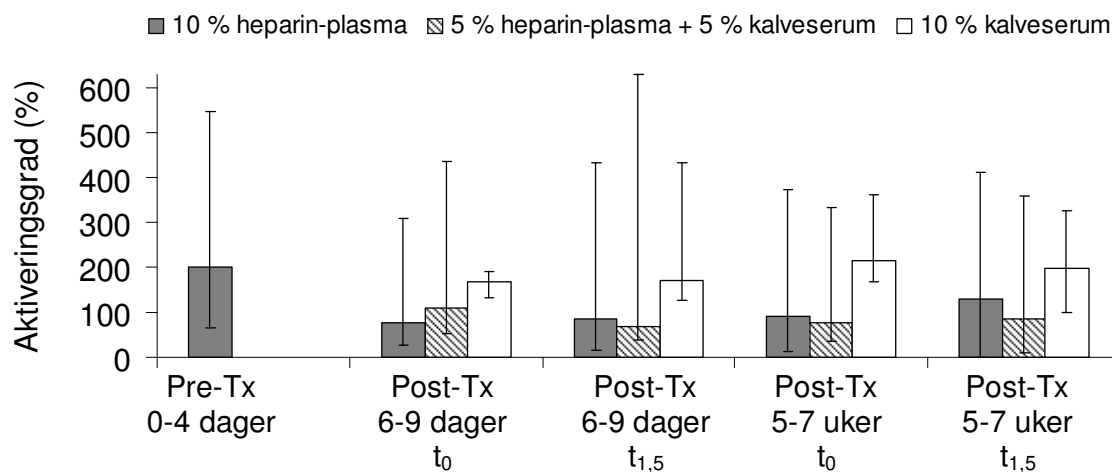


Figur 26. Linearitet mellom AUC_r og minimumsnivå før nyretransplantasjon.

Figurtekst figur 26. PBMC (mononukleære celler fra perifert blod) fra fem pasienter ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat og 2,5 µg/mL ionomycin og inkubert med ulike konsentrasjoner av hvert enkelt immundempende legemiddel: A) Ciklosporin, B) Takrolimus, C) Mykofenolat, D) Everolimus, E) Sirolimus. Arealet under responskurvene (AUC_t) ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden og minimumsnivå ble estimert ved nonlinear regresjonsanalyse ved hjelp av GraFit versjon 5 programvare. Korrelasjon (R^2) ble beregnet ved lineær regresjonsanalyse.

6-9 dager og 5-7 uker etter transplantasjon

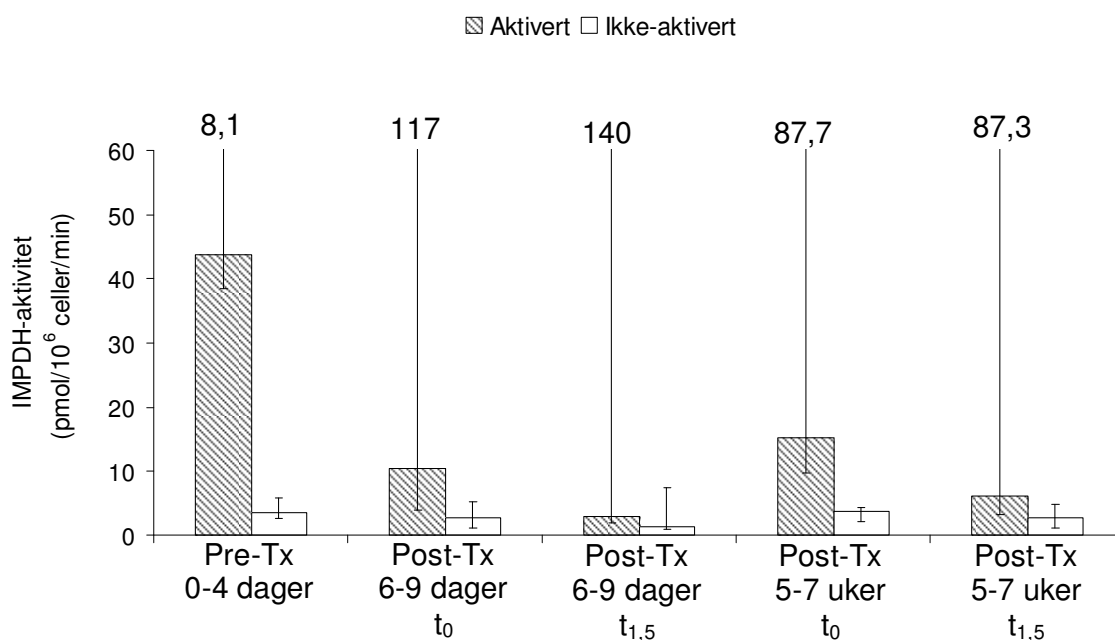
Ved t_0 og $t_{1,5}$, 6-9 dager og 5-7 uker etter transplantasjon ble metabolsk aktivitet kvantifisert i aktiverte og ikke-aktiverede PBMC og aktiveringsgraden ble beregnet. For fire av pasientene ble ulike kombinasjoner med heparin-plasma fra klinisk prøve og kalveserum utprøvd som tilsetning i medium A. I hvilken grad de ulike kombinasjonene påvirket aktiveringsgraden er vist i figur 27. Aktiveringsgraden etter transplantasjon var generelt høyere der plasma ble byttet ut med kalveserum. Aktiveringsgraden varierte fra 1,5-40 ganger mellom pasientene etter transplantasjon og den var tilsynelatende lavere enn før transplantasjon. Målingene indikerte at det ikke var noen forskjell mellom t_0 og $t_{1,5}$.



Figur 27. Aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler fra perifert blod) fra fem pasienter før og etter nyretransplantasjon. Tilsetning av heparin-plasma fra klinisk prøve sammenliknet med kalveserum. Pre-Tx (0-4 dager før transplantasjon) og Post-Tx (6-9 dager og 5-7 uker etter nyretransplantasjon) ved t_0 (rett før inntak av legemiddeldose) og $t_{1,5}$ (1,5 timer etter inntak av legemiddeldose) ble PBMC aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat og 2,5 µg/mL ionomycin. WST-1 ble tilsatt etter 72 timers inkubering og videre inkubert i 4 timer. Mediet RPMI 1640 ble tilsatt 10 % heparin-plasma, 5 % heparin-plasma + 5 % kalveserum eller 10 % kalveserum. Legemidler som ble brukt: takrolimus, mykofenolat, (metyl)prednisolon og basiliximab. Median (min-maks), n = 5 pasienter (Pre-Tx, heparin-plasma), n = 5 pasienter (Post-Tx, heparin-plasma), n = 4 (Post-Tx, heparin-plasma + kalveserum og kalveserum).

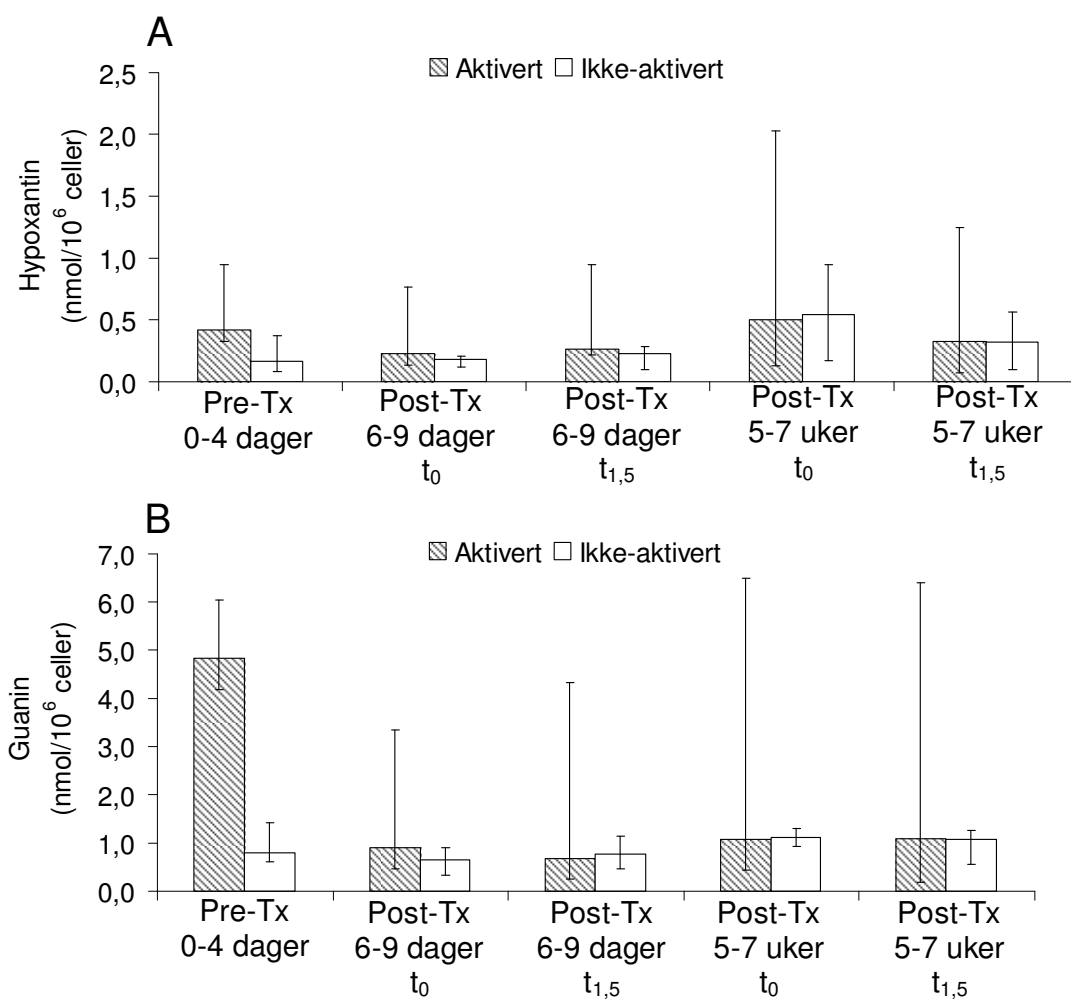
5.4.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser som biomarkører

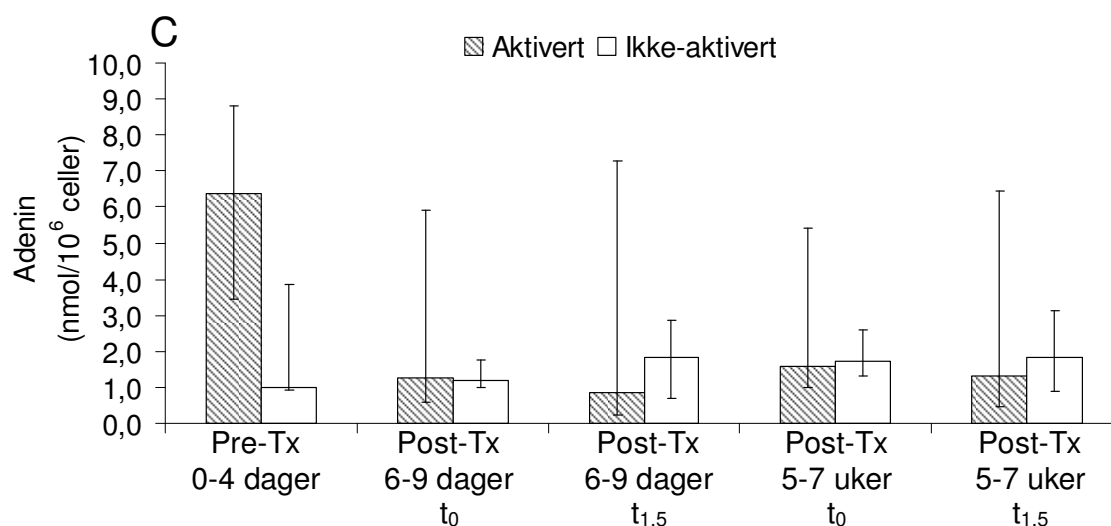
Basert på medianverdi var IMPDH-aktiviteten generelt sett høyere i aktiverte PBMC sammenliknet med ikke-aktiverte PBMC (figur 28). Høyest IMPDH-aktivitet ble observert i aktiverte PBMC før transplantasjon. Her var enzymaktiviteten median 44 pmol/10⁶ celler/min. IMPDH-aktiviteten i aktiverte PBMC sank betydelig etter transplantasjon da immundempende legemiddelbehandling, inkludert MPA, var startet. Ved t₀ 6-9 dager etter transplantasjon var IMPDH-aktiviteten i aktiverte celler median 10,3 pmol/10⁶ celler/min og ved t₀ (5-7 uker) var den median 15,2 pmol/10⁶ celler/min. Ved t_{1,5} (6-9 dager) og t_{1,5} (5-7 uker) var IMPDH-aktiviteten i aktiverte celler henholdsvis median 43,3 % og 58,9 % lavere enn ved t₀. Basert på medianverdier var IMPDH-aktiviteten til ikke-aktiverte PBMC 93 % lavere enn aktiverte celler før transplantasjon. Ved t_{1,5} (6-9 dager) og t_{1,5} (5-7 uker) var IMPDH-aktiviteten i ikke-aktiverte celler henholdsvis median 48,6 % og 22,6 % lavere enn ved t₀. Det var stor variasjon i IMPDH-aktivitet mellom pasientene og 2 - 72 ganger forskjell ble observert ved de ulike tidspunktene



Figur 28. IMPDH-aktivitet målt i aktiverte og ikke-aktiverte PBMC (mononukleære celler fra perifert blod) fra fem pasienter før og etter nyretransplantasjon. Pre-Tx (0-4 dager før transplantasjon) og Post-Tx (6-9 dager og 5-7 uker etter nyretransplantasjon) ved t₀ (rett før inntak av legemiddeldose) og t_{1,5} (1,5 timer etter inntak av legemiddeldose) ble PBMC fortynnet i medium RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 800 000 celler/mL og aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat og 2,5 µg/mL ionomycin og inkubert i 72 timer. Legemidler som ble brukt: takrolimus, mykofenolat, (metyl)prednisolon og basiliximab. Median (min-maks), n = 5 pasienter. Inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH).

De høyeste nivåene av purinbasene ble observert i aktiverte PBMC før transplantasjon. Her var nivåene av hypoxantin, guanin og adenin generelt sett høyere i aktiverte sammenliknet med ikke-aktiverte PBMC (figur 29). Etter transplantasjon ble nivåene av guanin og adenin i aktiverte celler betydelig redusert i forhold til før transplantasjon. Ved $t_{1,5}$ (6-9 dager), t_0 og $t_{1,5}$ (5-7 uker) etter transplantasjon var nivået av adenin i ikke-aktiverte PBMC median 8-50 % høyere i forhold til aktiverte PBMC. Nivået av hypoxantin var noe høyere ved $t_{1,5}$ sammenliknet med t_0 , mens nivåene av guanin og adenin i aktiverte PBMC var forholdsvis like ved t_0 og $t_{1,5}$. Ved t_0 5-7 uker etter transplantasjon var nivået av hypoxantin median 38 % høyere i aktiverte PBMC sammenliknet med $t_{1,5}$. Nivåene av guanin og adenin i aktiverte PBMC ved t_0 og $t_{1,5}$ 5-7 uker etter transplantasjon var forholdsvis like, men nivået av adenin i ikke-aktiverte PBMC var høyere i forhold til aktiverte PBMC ved begge tidspunktene.





Figur 29. Purinbaser målt i aktiverte og ikke-aktiverte PBMC (mononukleære celler fra perifert blod) fra fem pasienter før og etter nyretransplantasjon. A) Hypoxantin, B) guanin, C) adenin. Pre-Tx (0-4 dager før transplantasjon) og Post-Tx (6-9 dager og 5-7 uker etter nyretransplantasjon) ved t_0 (rett før inntak av legemiddeldose) og $t_{1,5}$ (1,5 timer etter inntak av legemiddeldose) ble PBMC fortynnet i medium RPMI 1640 tilsatt 10 % heparin-plasma til 800 000 celler/mL og aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat og 2,5 μ g/mL ionomycin og inkubert i 72 timer. Legemidler som ble brukt: takrolimus, mykofenolat, (metyl) prednisolon og basiliximab. Median (min-maks), $n = 5$ pasienter.

5.4.3 Cytokiner som biomarkører

Kvantifisering av cytokinutskillelse i aktivert fullblod ble utført etter henholdsvis 3 og 72 timers inkubering, mens det i aktiverte PBMC ble utført etter 72 timers inkubering. Det ble samlet inn og analysert cytokinutskillelse i prøver fra fem pasienter ved alle tidspunktene før og etter transplantasjon, med unntak av 5-7 uker etter transplantasjon i fullblod og PBMC som ble inkubert i 72 timer, hvor cytokiner ble analysert i prøver fra fire av pasientene.

Supernatant fra fullblod og PBMC som var inkubert i 72 timer ble fortynnet 10 ganger, og supernatant fra fullblod som var inkubert i 3 timer ble fortynnet 2 ganger i medium B. Utskillelse av IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α ble kvantifisert i pg/mL. Analytisk VK for målingene av de fem cytokinene var lavere enn 11 % (supernatant fra aktivert fullblod, 72 timer; $n = 8$).

Basert på medianverdier var det generelt høyere konsentrasjon av de fem cytokinene i fullblod som var inkubert i 72 timer sammenliknet med 3 timer. Det var mulig å måle

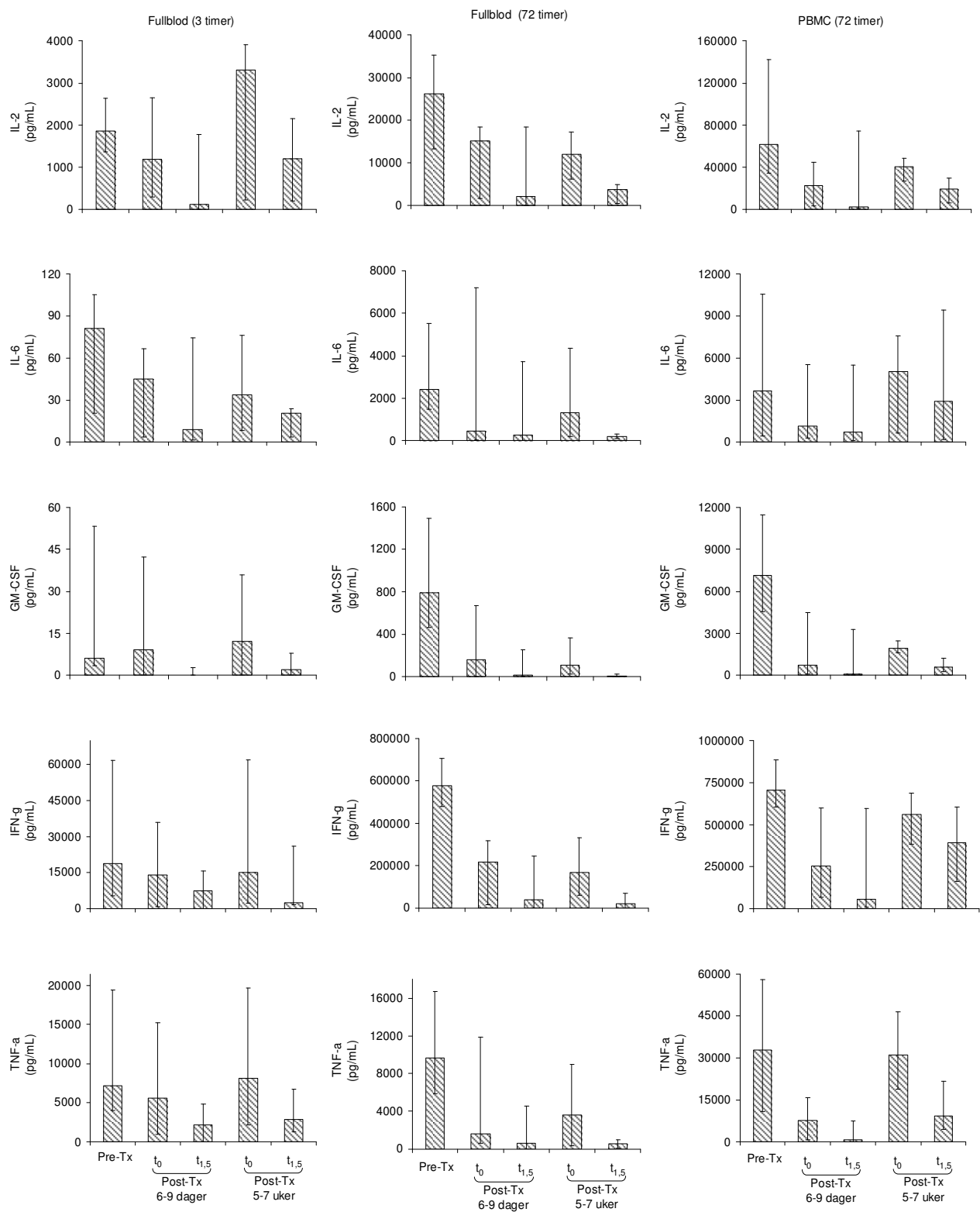
konsentrasjonene av alle cytokinene utskilt fra både fullblod og PBMC ved de to ulike inkuberingstidene med unntak av GM-CSF i fullblod som var inkubert i 3 timer (figur 30). Flere verdier for GM-CSF (ved 3 timer) falt utenfor kalibreringsområdet under laveste kalibrator, og ble av den grunn ikke målt. Ved beregning av median cytokinkonsentrasjon for pasientene ble disse verdiene satt til 0 pg/mL. Omtrent 50 % av konsentrasjonene for IFN- γ i fullblod og PBMC som var inkubert i 72 timer, ble beregnet ved ekstrapolering siden konsentrasjonene var over høyeste kalibrator.

Konsentrasjonene av de fem cytokinene var generelt høyest før transplantasjon i både fullblod og PBMC ved begge inkuberingstidene. Cytokinkonsentrasjonene ble i hovedsak redusert etter transplantasjon og oppstart med immundempende behandling. De laveste nivåene ble observert 1,5 timer etter inntatt legemiddeldose 6-9 dager etter transplantasjon. Resultatene indikerte at cytokinutskillelsen før transplantasjon og hemmingen av cytokinutskillelse etter transplantasjon varierte betydelig mellom pasientene. Relative nivåer er oppsummert i tabell D og de absolutte cytokinnivåene er vist i figur 30.

Tabell D. Relative nivåer av cytokiner etter nyretransplantasjon.

Celler	Cytokin	Post-Tx 6-9 dager			Post-Tx 5-7 uker		
		% av Pre-Tx		% av t0	% av Pre-Tx		% av t0
		Ved t ₀	Ved t _{1,5}	Ved t _{1,5}	Ved t ₀	Ved t _{1,5}	Ved t _{1,5}
Fullblod (3 timer)	IL-2	87 (16-120)	9,0 (0,1-95)	10 (0,8-79)	131 (16-253)	57 (14-138)	55 (17-221)
	IL-6	67 (4,5-218)	8,7 (1,4-360)	32 (11-165)	51 (10-129)	23* (4,2-24)	44* (31-71)
	GM-CSF	-	-	-	-	-	-
	INF- γ	58 (17-75)	25 (0-51)	43 (0-68)	100 (11-386)	42 (7,7-196)	42 (16-71)
	TNF- α	71 (20-106)	20 (0,8-61)	25 (4,0-86)	101 (28-326)	34 (18-129)	40 (20-132)
Fullblod (72 timer)	IL-2	51 (10-115)	7,4 (0-86)	11 (0,1-102)	60 (17-66)	13 (3,1-18)	28 (4,8-51)
	IL-6	9,0 (1,0-232)	11* (0,2-120)	43* (1,9-555)	33 (13-140)	5,9 (4,0-11)	25 (2,2-51)
	GM-CSF	34 (0-50)	0,7 (0-43)	8,1 (0-87)	8,8 (5,1-28)	0,5 (0-1,8)	3,3 (0-7,5)
	INF- γ	38 (2,6-46)	5,4 (0-48)	12 (0-104)	31 (10-47)	3,8 (0,2-9,6)	13 (1,5-21)
	TNF- α	22 (10-71)	8,8 (0,2-41)	40 (2,0-108)	36 (4,7-53)	4,7 (0,6-6,7)	13 (11-16)
PBMC (72 timer)	IL-2	25 (7,9-61)	2,8 (0,9-101)	14 (6,1-166)	68 (23-77)	28 (9,0-41)	46 (22-62)
	IL-6	47 (11-150)	28 (3,3-119)	76 (36-251)	88 (37-206)	114 (13-824)	54 (29-153)
	GM-CSF	7,0 (1,8-62)	0,9 (0,1-45)	17 (3,2-73)	23 (14-34)	6,1 (2,8-26)	32 (14-49)
	INF- γ	28 (9,9-81)	8,0 (1,0-81)	16 (10-100)	73 (63-86)	48 (26-79)	65 (39-92)
	TNF- α	16 (5,4-79)	1,7 (0,9-37)	25 (5,2-48)	78 (58-135)	29 (12-56)	32 (21-47)

*En verdi mangler pga. teknisk feil ved analysen. Nivåene av GM-CSF i fullblod (3 timer) var svært lave og usikre, og er derfor utelatt. Verdiene er oppgitt som median (min-maks), n = 5 (unntatt Post-Tx 5-7 uker, 72 timer inkubering hvor n = 4)



Figur 30. Cytokiner målt i aktivert fullblod og aktiverte PBMC før og etter transplantasjon.

Figurtekst figur 30. Fullblod og PBMC ble aktivert med 50 ng/mL phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), 5,0 og 2,5 µg/mL ionomycin per rør. Aktivert fullblod ble inkubert i 3 timer og 72 timer. Aktiverte PBMC ble inkubert i 72 timer. Cytokinkonsentrasjon ble målt i pg/mL. Pre-Tx (0-2 dager før transplantasjon), Post-Tx (6-9 dager etter transplantasjon), Post-Tx (5-7 uker etter transplantasjon), t_0 (før inntak av legemiddeldose) og $t_{1,5}$ (1,5 timer etter inntak av legemiddeldose). Legemidler som ble brukt: takrolimus, mykofenolat, (metyl)prednisolon og basiliximab. Median (min – maks), $n = 5$ ($n = 4$ ved Post-Tx_{5-7 uker} i fullblod og PBMC som ble inkubert 72 timer).

6 DISKUSJON

6.1 Utprøving av betingelser for *ex vivo* immunaktivering

Formålet med metodeutviklingen var å etablere en metode med optimale betingelser for *ex vivo* aktivering og kvantifisering av biomarkørene; metabolsk aktivitet av dehydrogenaser (WST-1), IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse i immunceller. Forutsetninger for valg av betingelser var at det skulle være tydelige forskjeller i responsen mellom aktiverte og ikke-aktiverte celler i tillegg til at akseptabelt resultat skulle kunne reproduseres med tilfredsstillende presisjon. Presisjonen i forsøkene ble definert som akseptabel når VK var < 20 %. Kvantifisering av biologiske markører krever omfattende metodeoppsett og noe høyere VK ble godtatt sammenliknet med hva som vanligvis godtas ved rutinemessige konsentrasjonsmålinger av legemidler i blod eller plasma (<15 %).

Metodeutviklingen ble utført med blodceller fra et begrenset antall friske personer (2 menn og 2 kvinner). I flere tilfeller ble forsøk utført med blod fra kun en person. Forskjeller mellom personene vil ved et begrenset antall ikke komme til syne, noe som medfører en viss risiko for å velge ikke-optimale betingelser. Med hensyn til forutsetningene for valg av betingelser, var imidlertid nivåendringene for de ulike biomarkørene generelt svært tydelige og det var dermed høy sannsynlighet for at forsøkene ville la seg reprodusere med cellemateriale fra andre personer. Stimulantkonsentrasjonene som ble benyttet har tidligere vist seg å være gunstig i forbindelse med aktivering av immunceller.

6.1.1 *Metabolsk aktivitet (WST-1) som biomarkør*

Det første forsøket på å kvantifisere metabolsk aktivitet ble utført med aktivert fullblod og etterfølgende isolering av PBMC. Resultatene pekte i retning av at fullblod ikke egnet seg som cellemateriale til utprøving av ulike stimulanter og inkuberingstider inntil 72 timer, på grunn av hemolyse under inkubering og følgelig tekniske utfordringer med isolering og telling av PBMC i etterkant. Ved hemolyse ødelegges celleveggen i røde blodceller (53). Årsaker til hemolyse kan være et resultat av for kraftig pipettering eller at blodet oppbevares i for høy temperatur som i dette tilfellet forekom ved inkubering i 37 °C opptil 72 timer.

Det er tidligere observert tydelig forskjell i metabolsk aktivitet mellom aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler hvor 10 % kalveserum var tilsatt (51). I denne masteroppgaven var det

ønskelig å undersøke om kalveserum kunne erstattes med heparin-plasma fra samme prøve som immuncellene ble isolert fra. Fordelen ved bruk av heparin-plasma, er at effektene av de immundempende legemidlene i plasmaen vil bli inkludert i testsystemet, noe som er gunstig når metoden skal benyttes i prøver fra nyretransplanterte pasienter som bruker immundempende legemidler. Filtret heparin-plasma fra opprinnelig prøve ble undersøkt som et annet alternativ til kalveserum. Ved filtrering av plasma fjernes blodplater og platederiverte vesikler, og hensikten var å undersøke om blodplatene påvirket den metabolske aktiviteten i de aktiverte cellene. Det ble observert noe lavere metabolsk aktivitet i aktiverte celler tilsatt kalveserum sammenliknet med heparin-plasma og filtrert heparin-plasma. Heparin-plasma og filtrert heparin-plasma ga tilsvarende resultater. Dette viste at filtrering ikke var nødvendig. Presisjonen på forsøket var god og det var betydelige forskjeller i metabolsk aktivitet mellom aktiverte og ikke-aktiverte celler. Heparin-plasma ble valgt fremfor filtrert heparin-plasma og kalveserum til kvantifisering av metabolsk aktivitet, nivå av purinbaser og IMPDH-aktivitet. Vi antok at heparin-plasma ville ha tilsvarende effekter ved kvantifisering av metabolsk aktivitet i PBMC.

I produktbeskrivelsen til celleproliferasjonsreagenset WST-1 ble det anbefalt å måle absorbans ved ulike inkuberingstider for WST-1 med hensikt å tilpasse inkuberingstiden til forsøksoppsettet. Årsaken er at optimal inkuberingstid avhenger av celletype og cellekonsentrasjon som ofte varierer mellom ulike metodeoppsett. Fire timer ble valgt som inkuberingstid ved utprøving i aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler, fordi absorbansen som ble lest av ved 4 timer lå i et tilnærmet lineært område. Det ble observert betydelig forskjell i metabolsk aktivitet mellom aktiverte og ikke-aktiverte CD4⁺ celler ved dette tidspunktet, i tillegg til at 4 timer er en praktisk håndterbar tid. VK for forsøket lå under 15 %. Vi antok at forløpet ville være tilsvarende for PBMC og valgte 4 timer som inkuberingstid i alle forsøkene hvor WST-1 ble tilsatt for kvantifisering av metabolsk aktivitet.

Kombinasjonen med PMA og ionomycin resulterte i høyest metabolsk aktivitet i PBMC etter 72 timers inkubering og det var tydelig forskjell mellom aktiverte og ikke-aktiverte celler. Presisjonen var god, selv om det imidlertid var høye relative standardavvik for noen av målingene (opp til 34 %). Dette kan skyldes variasjon i mengde celler som har blitt overført fra fortynnet suspensjon til brønner i avlesningsbrettet. For å forbedre presisjonen for målingene bør man sikre at cellene er tilstrekkelig fordelt i cellesuspensjonen før overføring. Alle stimulantene medførte tilsynelatende forhøyet metabolsk aktivitet også ved 0 timer. En

liten absorbans vil oppstå når man tilsetter WST-1 i medium som ikke inneholder celler. Bakgrunnsabsorbansen er i utgangspunktet avhengig av cellefortynningsmediet, inkuberingstid og lyseksponering. For å forhindre høy bakgrunnsabsorbans ble brettet tildekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie rett etter inkubering og inntil avlesning. I følge produktbeskrivelsen til WST-1 er vanlig bakgrunnsabsorbans etter 2 timer mellom 0,1 – 0,2. Det ble kontrollert at stimulantene i seg selv ikke bidro til absorbansen ved 450 nm. Det er derfor ukjent hvorfor tilsetning av stimulanter øker absorbansen ved 0 timers stimulering. En forklaring kan være at stimulantene aktiverer cellene i løpet av inkuberingen med WST-1, og at disse 4 timene er tilstrekkelig til å gi en økt absorbans. En annen forklaring kan være at stimulantene induserer en midlertidig aggregering av cellene og at dette påvirker lysabsorbansen gjennom cellesuspensjonen. Ved 24 timer ble den metabolske aktiviteten redusert i PBMC som var aktivert med henholdsvis PHA+PMA+ionomycin og PMA+ionomycin. Det kan være tenkelig at PMA og/eller ionomycin er årsaken til reduksjonen ved 24 timer siden PHA førte til jevn og stigende metabolsk aktivitet. På en annen side kan det være tilfelle at den metabolske aktiviteten ved 0 timer er falsk forhøyet, slik at det i utgangspunktet ikke er en reduksjon ved 24 timer, selv om det av grafene ser ut til at det er en reduksjon.

På grunn av at høyest metabolsk aktivitet ble påvist i PBMC etter 72 timers inkubering med PMA og ionomycin, ble disse valgt som stimulanter og 72 timer som inkuberingstid for kvantifisering av metabolsk aktivitet i PBMC. Tilsvarende mønster ble sett i tre forsøk med PBMC fra tre friske personer. Reproduserbarheten styrket valg av stimulanter og inkuberingstid. En tydelig økning i metabolsk aktivitet ble målt ved 72 timer også i CD4⁺ celler. PBMC ble valgt som celletype ved kvantifisering av metabolsk aktivitet fordi isolering av PBMC er mindre tidkrevende og krever mindre reagenser i forhold til isolering av CD4⁺ celler. Celleutbyttet ved isolering av PBMC er mye større sammenlignet med isolering av CD4⁺ celler. Dette innebærer at man trenger et mindre blodvolum som utgangspunkt for isolering når man anvender PBMC.

Ved valg av cellekonsentrasjon ble det tatt utgangspunkt i konsentrasjonen som ga størst forskjell i metabolsk aktivitet mellom aktiverte og ikke-aktiverte PBMC. En cellekonsentrasjon på 400 000 celler/mL ble valgt til kvantifisering av metabolsk aktivitet, fordi det ved denne konsentrasjonen ble beregnet høyest aktiveringsgrad i PBMC som var aktiverte og inkubert med PMA og ionomycin i 72 timer. Resultatet var basert på PBMC fra

tre personer og forsøkene hadde akseptabel presisjon. Aktiveringsgraden avtok ved konsentrasjoner over 400 000 celler/mL. I innledende forsøk ble 800 000 celler/mL brukt som konsentrasjon fordi det hadde vist seg å fungere tilfredsstillende med CD4⁺ celler (51). Lavere cellekonsentrasjon åpner muligheten for å øke antall målepunkter, noe som kan styrke presisjonen. Når man benytter et mindre antall celler til måling av metabolsk aktivitet, vil man alternativt kunne få mulighet til å måle andre biomarkører i samme cellemateriale.

6.1.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser som biomarkør

Etter to tilsvarende forsøk viste det seg at aktivering av fullblod med PHA, PMA og ionomycin i ulike kombinasjoner og videre isolering av PBMC ikke ga reproducerbare resultater. En mulig årsak kan være at det aktiverte fullblodet viste tegn til hemolyse under inkubering. Dette vanskeliggjorde det tekniske arbeidet med isolering av PBMC i etterkant som førte til svært høye celletall. Det er en mulighet at hemolyserte røde blodceller ikke separeres fra PBMC og blir inkludert i populasjonen av celler som telles.

Som forventet ut ifra tidligere studier hvor det er rapportert sammenheng mellom økt celleproliferasjon og økt IMPDH-aktivitet, var IMPDH-aktiviteten høyere i aktiverte PBMC og CD4⁺ celler i forhold til ikke-aktiverte celler (36,54). Samme økende tendens ble sett for alle purinbasene i begge celletypene, med unntak av hypoxantin i CD4⁺ celler hvor noen av verdiene kom under kvantifiseringsgrensen og derfor var usikre. Med hensyn til når det ble observert høyest IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser og hvor stor forskjell det var i nivåene mellom aktiverte og ikke-aktiverte celler, ble et tilsvarende mønster sett for begge celletypene. Nivåene var høyest etter 72 timers inkubering. I PBMC var det kun marginale forskjeller i IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser når de ulike kombinasjonene med stimulanter ble sammenliknet, noe som kan tyde på at alle kombinasjonene kan fungere like godt og være aktuelle kandidater for å aktivere PBMC for kvantifisering av IMPDH-aktivitet og purinbaser. Imidlertid viste det seg at nivåene av guanin og adenin hadde en tendens til å være høyere i ikke-aktiverte PBMC i forhold til aktiverte celler ved henholdsvis 0 og 3 timer. Dette kom tydeligst frem for adenin. Det er usikkert hva denne mulige forskjellen kan skyldes.

Resultatene pekte i retning av at aktivert fullblod ikke egnet seg som cellemateriale for kvantifisering av IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser. Både CD4⁺ celler og PBMC viste

seg å være aktuelle kandidater for disse biomarkørene. PBMC er mindre tidkrevende å isolere, utbyttet av celler etter isolering er større og det kreves av den grunn et mindre blodvolum i forhold til CD4⁺ celler. Økonomisk sett vil det være billigere å isolere PBMC i forhold til CD4⁺ celler fordi det kreves færre reagenser. Imidlertid kan bestemmelse av IMPDH-aktivitet i CD4⁺ celler være mer klinisk relevant med tanke på at aktiveringsprinsippet med antistoffer mot CD3 og CD28 er tilnærmet den fysiologiske immunaktivering som CD4⁺ celler er direkte involvert i de immunologiske prosessene (37). Av den grunn er det gunstig å kunne sammenlikne resultatene fra PBMC med CD4⁺ celler i dette forsøket. Fordelene ved bruk av PBMC avgjorde valg av celletype, og etter sammenlikning av resultatene fra de to celletypene som viste et liknende mønster, ble PBMC valgt som celletype for kvantifisering av IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser. Kvantifisering av IMPDH-aktivitet i PBMC er utbredt, men det er observert at deler av MPA-innholdet i cellene kan gå tapt og bli vasket ut under selve isoleringen. Det kan bidra til unøyaktige resultater når IMPDH-aktivitet i PBMC blir målt som respons på MPA-behandling (37). Siden inkuberingsmediet blir tilsatt 10 % heparin-plasma som inneholder den kliniske MPA-konsentrasjonen, vil dette kompensere for at MPA vaskes ut av cellene under isoleringen og være avgjørende for responsen som måles. Alle stimulantkombinasjonene viste seg å aktivere PBMC på en tilfredsstillende måte. PMA og ionomycin valgt som stimulanter for PBMC. Samme kombinasjon av stimulanter ble valgt til kvantifisering av metabolsk aktivitet (WST-1). Det vil være mer praktisk å bruke samme stimulanter og inkuberingstid når de ulike biomarkørene skal kvantifiseres. Resultatene for forsøket i henholdsvis CD4⁺ celler og PBMC er basert på ett målepunkt. For å styrke presisjonen og nøyaktigheten til resultatene kan antall målepunkter økes.

6.1.3 Cytokiner som biomarkør

Ved kvantifisering av cytokinene IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α i cellesupernatant, havnet flere av konsentrasjonene (pg/mL) utenfor kalibreringsområdet. Under metodeutviklingen ble derfor fluorescens fra spesifikke fluorofor-koblede antistoffer betraktet som mål på cytokinutskillelse ved analyse av prøver på samme 96-brønners brett. Fluorescensverdiene er direkte relatert til cytokinutskillelsen og ga et bilde av hvor stor utskillelsen av de ulike cytokinene var i de ulike celletypene som ble undersøkt.

Det var ikke mulig å måle fluorescens i ustimulerte celler. Generelt sett for alle celletypene (fullblod, CD4⁺ celler og PBMC) lå fluorescensen for cytokiner i ustimulerte celler på nivå

med bakgrunnsfluorescensen. Sullivan et al. målte nivå av cytokinutskillelse i stimulerte (PHA, PMA) og ustimulerte PBMC og viste at utskillelsen av cytokinene (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ og TNF- α) i ustimulerte celler var svært lav i forhold til stimulerte celler, hvor nivået var opptil 91 ganger høyere for TNF- α (42). Tilsvarende resultat er tidligere vist for IL-2 og TNF- α i fullblod som var stimulert med PMA og ionomycin i sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 15 ng/mL og 0,75 μ g/mL. Analysemetoden som ble brukt var forskjellig fra Luminex-metoden som vi brukte (33).

Aktivering av CD4⁺ celler med antistoffer mot CD3 og CD28 og aktivering av PBMC med mitogenene PHA, PMA og ionomycin er ment for å etterlikne den fysiologiske immunaktiveringen. De lave nivåene i ustimulerte celler og høye nivåer i stimulerte celler, kan tyde på at IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α er svært avhengig av en immunrespons for at de skal produseres og skilles ut. Det kunne ha vært fordelaktig å kunne måle cytokinenes nivåer også i ustimulerte celler, siden man da kunne beregnet relative forskjeller mellom stimulerte og ustimulerte celler.

Aktivert fullblod og PBMC ble vurdert som aktuelt cellemateriale til kvantifisering av cytokinutskillelse, da fluorescens i CD4⁺ celler lå på et lavere nivå. Valg av stimulanter og inkuberingstid for fullblod og PBMC ble gjort med utgangspunkt i hvilke betingelser som ga høyest cytokinutskillelse målt som fluorescens. Yaqoob et al. kom frem til at stimulert fullblod i like stor grad som stimulert PBMC egnet seg som cellemateriale til kvantifisering av cytokinutskillelse (IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-10 og IFN- γ) (41). Fordelen med å måle cytokinutskillelse i fullblod i forhold til PBMC, er at fullblod inneholder alle blodets komponenter (inkludert legemidler og metabolitter) og alle blodcellene i riktig forhold. Fullblod krever ingen form for prøveopparbeidelse eller isolering og er av den grunn både enklere og mindre tidkrevende. Det kreves mindre utstyr og færre reagenser ved håndtering av fullblod, og det er av den grunn mer økonomisk å bruke. Imidlertid er at antall celler som inngår i en gitt mengde fullblod ukjent fordi det ikke foretas noen form for celledelling før stimulering. Antall cytokinproduserende celler kan variere mellom individer og blir ved bruk av fullblod ikke tatt i betraktning. Vi valgte å gå videre med både fullblod og PBMC i forsøkene hvor legemidlenes effekter på cytokinene ble undersøkt. Generelt sett var det kun marginale forskjeller mellom cytokinutskillelse i fullblod og PBMC som var aktivert med PHA+PMA+ionomycin og PMA+ionomycin. I likhet med analyse av metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser, ble PMA og ionomycin også her valgt som

stimulanter. Det er en fordel å kunne benytte samme stimuleringsmedium for alle biomarkørene. Cytokinutskillelse ble målt etter 3, 24, 48 og 72 timers inkubering. 3 timer ble valgt å ta med siden enkelte av cytokinene er målbare etter så kort tid. I tillegg er 3 timer en mer praktisk tid sammenliknet med 72 timer. Det er også en mulighet for at legemiddeleffekten kan være forskjellig i løpet av 3 timer sammenliknet med 72 timer. På tross av at nivåene av IL-6 og TNF- α i fullblod ble redusert etter henholdsvis 48 og 24 timer, valgte vi å gå videre med både 3 og 72 timer. Dette tidsintervallet var ikke optimalt for IL-6 og TNF- α , men et valg ble tatt på bakgrunn av responsen til de andre cytokinene. Det er fordel om samme inkuberingstid kan brukes for analyse av alle biomarkørene. Resultatene fra dette forsøket er basert på enkeltmålinger og har dermed en del usikkerhet forbundet med seg.

6.2 Effekter av immundempende legemidler på biomarkørene

6.2.1 Metabolsk aktivitet i PBMC fra friske personer

Metabolsk aktivitet av dehydrogenaser ble valgt som markør for å undersøke konsentrasjonsavhengige effekter de immundempende legemidlene hadde på aktiveringsgraden til *ex vivo* aktiverte PBMC. Vi antok at metabolsk aktivitet kunne regnes som en generell markør på cellenes aktiveringsstatus på og dermed gjenspeile immunsuppresjon uavhengig av legemidlenes virkningsmekanisme. Metabolsk aktivitet som mål på celleproliferasjon har vært betraktet som generell biomarkør i andre studier av T-celleproliferasjon (32).

Det ble konstruert legemiddelresponskurver for alle legemidlene ved å plote aktiveringsgrad mot legemiddelkonsentrasjoner. Alle legemidlene viste tegn til å nedsette aktiveringsgraden med økende legemiddelkonsentrasjon. Alle legemidlene med unntak av prednisolon viste et systematisk non-lineært forløp hvor kurvene flatet ut ved de høyeste konsentrasjonene. Konsentrasjonene av prednisolon var svært høye, og de er tidligere vist å være tilstrekkelige for å lage responskurver i CD4+ celler aktivert via CD3 og CD28 (51). Det kan tenkes at aktiveringen med PMA og ionomycin i mindre grad involverer gentranskripsjonen som prednisolon har sin virkning på. Høyere konsentrasjoner av prednsiolon skulle utprøves i videre forskning.

MPA medførte svært lav aktiveringsgrad ved høyeste konsentrasjon (60 $\mu\text{mol/L}$): her var metabolsk aktivitet i aktiverte celler lavere enn i ikke-aktiverte celler. Tilsvarende tendens for MPA (200 ng/mL) er sett i stimulerede PBMC (PHA) ved bruk av carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester flowcytometri (32). Vi observerte at aktiveringsgraden ble nedsatt 98 % ved høyeste konsentrasjon av MPA. Det ser altså ut til at MPA har kapasitet til å nedsette mer av den metabolske aktiviteten enn hva immunaktivering utgjør. Ikke-aktiverte celler ble også inkubert med MPA, men den metabolske aktiviteten ble ikke tilsvarende redusert i disse (resultater ikke vist). Dette kan tyde på at effekten av MPA potensieres ved aktivering av immuncellene. Det kan være at aktiverte celler som i stor grad trenger guanin-nukleotider, blir apoptotiske når MPA hemmer syntesen av disse nukleotidene. En annen forklaring kan ligge i den molekylære virkemekanismen til MPA. Legemidlet er en såkalt unkompetitiv inhibitor, noe som innebærer at MPA binder seg til IMPDH og hemmer enzymet kun etter at substratet IMP har bundet seg. Siden immunaktivering medfører oppregulert purinsyntese og dermed økt nivå av IMP, vil aktiveringen også kunne øke MPAs binding til IMPDH.

De ble utført to målepunkter per legemiddelkonsentrasjon. Den grafiske fremstillingen av de to parallelle målingene var forholdsvis sammenfallende og i videre forsøk ble det valgt å bruke en måling per legemiddelkonsentrasjon. Det ble undersøkt at legemidlene i seg selv ikke bidro til absorbans ved 450 nm. Metanol viste heller ikke betydelige tegn til å påvirke absorbansen i stimulerede celler, da det kun var marginale forskjeller mellom stimulerede PBMC som var tilsatt enten metanol og RPMI 1640.

IC_{50} ble estimert ut ifra responskurvene for hvert legemiddel som mål på legemiddelkonsentrasjon som nedsatte aktiveringsgraden 50 %. IC_{50} kan betraktes som et relevant mål på individuell sensitivitet ovenfor immundempende legemidler (32). Maksimal inhibering, minimumsnivå og AUC_r kan i tillegg være aktuelle mål på legemiddelsensitivitet. Sannsynligvis kan ikke IC_{50} verdiene som estimeres i *ex vivo* forsøkene direkte relateres til IC_{50} i blodet *in vivo*, men dersom IC_{50} estimeres på bakgrunn av legemiddelresponskurver for flere pasienter, kan verdiene betraktes i forhold til hverandre og danne et bilde av variasjonen i legemiddelsensitiviteten mellom de ulike pasientene. Immundempende legemidler er kandidater for TDM, og med mål om individualisert legemiddelbehandling, kan det tenkes at nyttigheten av å undersøke legemiddelsensitivitet for en pasient er størst før transplantasjon når pasienten ikke har startet opp med immundempende behandling. Dersom man kan si noe

om hvor sensitiv en pasient er overfor immundempende legemidler før transplantasjon og behandlingsoppstart, kan det bidra til å tilpasse legemiddelbehandling til den enkelte pasient med hensikt å redusere forekomsten av bivirkninger og toksisitet, samt faren for avstøtning (32). De innledende resultatene fra metodeutviklingen var basert på blodceller fra to friske personer. For å si mer om den kliniske nytteverdien av denne målemetoden på legemiddelsensitivitet, bør det undersøkes hvordan målingene kan fremstilles i en relevant pasientpopulasjon. I denne masteroppgaven ble tilsvarende forsøk utført med blodprøver fra fem pasienter før nyretransplantasjon fra levende giver.

6.2.2 IMPDH-aktivitet i PBMC fra friske personer

Legemiddelkonsentrasjonene som ble ansett som relevante for å undersøke effekten de immundempende legemidlene hadde på IMPDH-aktivitet og purinbaser, var konsentrasjonen som lå nærmest IC_{50} fra forsøket med metabolsk aktivitet (WST-1), og den høyeste konsentrasjonen som ga maksimal inhibering av aktiveringsgraden. Vi antok at legemidlenes effekt på IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ville komme til syne ved de valgte konsentrasjonene.

IMPDH-aktivitet betraktes som en spesifikk farmakodynamisk markør for MPAs effekt. Ut i fra MPAs virkningsmekanisme forventet vi en nedgang i IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC som var tilsatt MPA. De forskjellige immundempende legemidlene ble testet i forsøket, og den mest markante effekten ble observert for MPA. Kraftig hemming av IMPDH-aktivitet ble observert ved den høyeste konsentrasjonen av MPA. Hemmingen var moderat ved konsentrasjonen nærmest IC_{50} . Også de andre legemidlene som ble testet, viste tegn til å kunne redusere IMPDH-aktiviteten i stimulerte PBMC. Det kan være en indirekte effekt som skyldes at de hemmer immunaktivering og dermed oppreguleringen av proteinet IMPDH. Dette forsøket indikerte at IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC ikke er en legemiddelspesifikk biomarkør for MPA, men at den til en viss grad også kan gjenspeile effekten av andre legemidler som hemmer immunaktivering. Den høyeste konsentrasjonen for prednisolon hemmet IMPDH-aktiviteten i liknende grad som høyeste konsentrasjon for mykofenolat. Konsentrasjonen av prednisolon som ble brukt i forsøket er imidlertid svært høy og sannsynligvis ikke klinisk relevant. Dette må tas i betraktning for å vurdere effekten som prednisolon viste å ha på IMPDH-aktiviteten i dette forsøket.

IMP fungerer som substrat for IMPDH, og kan kjemisk hydrolyseres til hypoxantin. Ut i fra teorien kan det tenke seg at MPAs hemming av IMPDH vil føre til opphopning av IMP og følgelig økte nivåer av målt hypoxantin. Hypoxantin viste en økende tendens i PBMC som var tilsatt kalsineurinhemmere, mTOR-hemmere og middels konsentrasjon med MPA, men ble redusert ved de høyeste konsentrasjonene av prednisolon og MPA. Det kan tenkes at hemmet immunaktivering ved tilsetning av prednisolon og MPA i høye konsentrasjoner medfører redusert purinsyntese, inkludert hypoxantin.

Reduserte nivåer for adenin og guanin ble observert ved begge konsentrasjonene for alle legemidlene. Nivåene av de to purinbasene utviste samvariasjon. Dette er i tråd med det som tidligere har blitt beskrevet i ustimulerte CD4⁺ celler fra levertransplanterte pasienter (55). Tilsvarende som for IMPDH-aktivitet hadde MPA størst innvirkning på reduksjonen av adenin og guanin. Dette indikerte at adenin og guanin ikke er en ren legemiddelspesifikk biomarkør for MPA i stimulerde PBMC.

6.2.3 Cytokiner i fullblod og PBMC fra friske personer

Konsentrasjon som lå nærmest IC₅₀, og den høyeste konsentrasjonen som ga maksimal inhibering av aktiveringsgraden ble valgt for å undersøke effektene de immundempende legemidlene hadde på cytokinutskillelse. Fullblod og PBMC ble aktivert med PMA og ionomycin og inkubert i 72 timer. Fluorescens ble brukt som mål på cytokinutskillelse fordi en del av konsentrasjonene (pg/mL) havnet utenfor metodens kalibreringsområde da supernatanten ble fortynnet 20 ganger. Resultatene hadde derfor en del usikkerhet forbundet med seg. Tilsvarende resultater ble observert for både fullblod og PBMC. Sammenliknet med kontrollen som kun inneholdt metanol, var det ingen systematiske endringer i cytokinutskillelse ved konsentrasjonene som var nærmest IC₅₀. Imidlertid var det kraftig reduksjon i cytokinutskillelse for alle cytokinene (IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α) ved den høyeste konsentrasjonen til ciklosporin, takrolimus og prednisolon. Böhler et al. observerte at takrolimus og CsA inhiberte uttrykket av IL-2, og effekten var doseavhengig (33). Opptil 100 % reduksjon ble observert ved de høyeste konsentrasjonene av CsA, takrolimus og prednisolon for alle cytokinene. Det kan tyde på at konsentrasjonene som ble valgt var for høye til å sammenligne effektene de immundempende legemidlene hadde på cytokinutskillelse. Forsøket bør gjentas med lavere legemiddelkonsentrasjoner. Da kan konsentrasjoner mellom IC₅₀ og høyeste konsentrasjon være et alternativ. For å unngå lave målinger utenfor kalibreringsområdet bør man fortynne supernatanten i mindre grad der

legemiddelkonsentrasjonene var forholdsvis høye. Imidlertid indikerte resultatene at både fullblod og PBMC kan egne seg som cellemateriale for å måle effekten immundempende legemidler har på cytokinutskillelse.

Resultatene fra forsøkene hvor effektene av immundempende legemidler på biomarkørene ble undersøkt, er basert på blod fra en person og kun ett målepunkt per legemiddelkonsentrasjon ($n = 1$). Vi kan dermed ikke trekke sikre konklusjoner om hvordan metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse blir påvirket av immundempende legemidler, men vi kan se tendensene. For å kunne trekke konklusjoner må forsøket gjentas med blod fra flere individer og gjerne flere målepunkter.

6.3 Pilotstudie

6.3.1 *Metabolsk aktivitet i PBMC fra nyretransplanterte*

Før transplantasjon ble det konstruert legemiddelresponskurver for ciklosporin, takrolimus, mykofenolat, sirolimus og everolimus. Responskurvene til prednisolon viste et usystematisk forløp og var av dårlig kvalitet. Vi valgte derfor å utelate kurvene til prednisolon fra videre beregninger. For å kunne tilpasse prednisolons konsentrasjonsområde for å lage responskurver av akseptabel kvalitet måtte det svært høye konsentrasjoner til (opp til 2000 $\mu\text{mol/L}$), noe som førte til løselighetsproblemer. Av den grunn kunne vi ikke stole på at konsentrasjonen i uttaksløsningen var korrekt. På tross av svært høy prednisolonkonsentrasjonen, ble det ikke oppnådd maksimal inhibering av den metabolske aktiviteten. Mulige årsaker kan knyttes til løselighetsproblemet og prednisolons virkningsmekanisme. De høye konsentrasjonene av prednisolon, har sannsynligvis vært lavere enn antatt fordi stoffet ikke var tilstrekkelig løst. Andre årsaker til dårlig kvalitet på responskurven til prednisolon kan være prednisolons effekt på PBMC som er aktivert med PMA og ionomycin. PMA og ionomycin har tidligere vist seg å være egnet til T-celleaktivering i proliferasjonsstudier (33). Imidlertid fører ikke PMA og ionomycin til en fysiologisk korrekt immunaktivering. Når legemiddelsensitivitet skal undersøkes ved hjelp av legemiddelresponskurver er det fordelaktig å kjenne til signalveiene som legemidlene påvirker. Prednisolon regulerer genuttrykket til en rekke gener og virker immundempende ved blant annet nedregulering av transkripsjonen til en rekke proinflammatoriske mediatorer. Dersom signalveiene som prednisolon regulerer ikke direkte påvirkes ved stimulering av PMA og ionomycin, kan det være en mulig forklaring på prednisolons utilstrekkelige effekt på metabolsk aktivitet.

Aktiveringsgraden varierte i stor grad mellom pasientene (66 % - 548 %). Varierende biologisk kapasitet med hensyn til immunaktivering, samt analytisk variasjon kan være mulige årsaker til den store interindividuelle variasjonen som ble observert. Absorbansmålinger som blir utført på ulike 96-brønners brett, kan bidra til variasjon. I tillegg kan antall PBMC som har blitt overført fra celsuspensjon til brønnene i brettet ha variert mellom pasientene. Dersom celletallet er for lite vil det gjenspeiles ved lav metabolsk aktivitet, og dette kan videre bli tolket som biologisk variasjon mellom pasientene. Med hensyn til forbedringer vil det være hensiktsmessig å få til en utførelse der de fleste avlesningene utføres på samme brett. Foruten analytisk variasjon kan den store interindividuelle variasjonen skyldes varierende biologisk kapasitet med hensyn til immunaktivering etter stimulering med PMA og ionomycin. Det kan være tenkelig at aktiveringsgraden før transplantasjon kan relateres til behovet for immundempende behandling. Kvantifisering av aktiveringsgraden kan da potensielt bidra til å tilpasse den medikamentelle immunsuppresjonen slik at risikoen for avstøtning og toksiske effekter reduseres. En liknende hypotese er tidligere demonstrert av Kurata et al.(32)

For å beskrive hvordan *ex vivo*-immunaktiveringen ble påvirket av de immundempende legemidlene før transplantasjon ble ulike variabler beregnet ut ifra legemiddelresponskurvene. Kurata et al. presenterte dose-responskurver for å undersøke immundempende legemidlers effekter på proliferasjonen av PBMC fra potensielle mottakere av nyre. Studien demonstrerte at bruk av minimumsnivå (nivå ved maksimal hemming) var mer klinisk relevant enn IC_{50} (31).

I vår pilotstudie varierte IC_{50} i mindre grad mellom pasientene i forhold til minimumsnivå og AUC_r . Denne observasjonen kan tenkes å støtte begrunnelsen på hvorfor minimumsnivå kan egne seg bedre som mål på legemiddelsensitivitet enn IC_{50} . Selv om pasienter har tilsvarende IC_{50} , er det ikke sikkert at aktiveringsgraden hemmes i like stor grad. Lavest minimumsnivå ble observert for mykofenolat. Det er tidligere vist at MPA nedsetter proliferasjonen av aktiverte PBMC betydelig hos pasienter med nyresykdom (32). Kurata et al. observerte at pasienter med lavt minimumsnivå for CsA var mer mottakelig for virussykdommer som følge av overimmunsuppresjon (32). mTOR hemmerne hadde lavest maksimal inhibering. Det kan tenkes at det kan ha sammenheng med at mTOR-hemmerne gir dårligere immunsuppresjon når de skal erstatte CNI. Det kan tenkes at variablene som beregnes ut i fra

legemiddelresponskurvene kan egne seg som verktøy for å tilpasse den enkelte pasients behov for immundempende behandling.

AUC_r beskriver arealet under responskurven. AUC_r ble plottet mot minimumsnivå for ciklosporin, takrolimus, mykofenolat, everolimus og sirolimus. Basert på R² verdier var det god korrelasjon mellom AUC_r og minimumsnivå. Forsøkene bør gjentas med prøver fra et større antall individer, men dersom den gode korrelasjonen er tilfelle, kan det tenkes at minimumsnivået kan brukes for å predikere AUC_r, og på den måten være et korrelat til totalresponsen og videre den enkelte pasients sensitivitet overfor legemiddelet.

Metabolsk aktivitet ble kvantifisert i aktiverte og ikke-aktiverte PBMC ved to tidspunkter etter transplantasjon. Heparin-plasma og kalveserum ble undersøkt som tilsetning i medium A for å se om de hadde ulik påvirkning av aktiveringsgraden. Generelt sett var aktiveringsgraden høyere der plasma var erstattet med kalveserum. Etter transplantasjon behandles pasientene med immundempende legemidler og det er sannsynlig at lavere aktiveringsgrad der heparin-plasma var tilsatt skyldes legemiddeleffekter fra plasmaandelen. Kalveserum som tilsetning etter transplantasjon ga aktiveringsgrad omtrent på nivå som før transplantasjon. Dette kan skyldes at legemidler delvis vaskes ut under isolering av PBMC, samt at man ikke får effekten av legemidlene som er i plasmaen fra klinisk prøve. Det tyder på at plasma fra klinisk prøve er nødvendig å bruke for å kunne se legemiddeleffekt etter transplantasjon. Målingene indikerte at det ikke var noen forskjell mellom aktiveringsgraden rett før inntak av legemiddeldose og 1,5 timer etter legemiddeldose, noe som kan tyde på at det ikke vil gi ekstra informasjon om man måler aktiveringsgraden også 1,5 timer etter inntak av legemiddel ved de to tidspunktene etter transplantasjon. Redusert aktiveringsgrad der heparin-plasma var tilsatt etter transplantasjon kan forventes ut i fra effektene de immundempende legemidlene har på aktivering og proliferasjon av lymfocytter. Følgende observerte vi også at den kombinerte effekten av de immundempende legemidlene medførte svært lav aktiveringsgrad etter transplantasjon.

6.3.2 IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser i PBMC fra nyretransplanterte

Basert på medianverdi var IMPDH-aktiviteten i aktiverte PBMC høyest før transplantasjon. Da blodprøver ble tatt før transplantasjon hadde ikke pasientene begynt med immundempende

behandling og resultatene er basert på enzymaktiviteten i aktiverte PBMC uten påvirkning av legemidler. MPA er en selektiv hemmer av IMPDH. Siden MPA var et av legemidlene pasientene ble behandlet med etter transplantasjon var det forventet høyere enzymaktivitet før transplantasjon. Det var betydelig interindividuelle forskjeller i IMPDH-aktivitet før transplantasjon hvor ca. 3 ganger variasjon ble observert mellom pasientene. Glander et al. observerte tilsvarende variasjon i ustimulerte PBMC fra nyretransplanterte pasienter rett før transplantasjon (56). Over 10 ganger variasjon har blitt observert for IMPDH-aktivitet i ustimulert fullblod fra friske personer (57).

IMPDH-aktiviteten sank betydelig ved første studiedag etter transplantasjon (6-9 dager) og lavest enzymaktivitet ble sett 1,5 time etter inntak av legemiddeldose. Fra t_0 til $t_{1,5}$ ble IMPDH-aktiviteten redusert median 43,3 % i stimulerter celler. Samme tendens ble sett ved andre studiedag etter transplantasjon (5-7 uker) hvor høyest IMPDH-aktivitet ble sett i stimulerter PBMC ved t_0 og lavest 1,5 timer etter inntak av legemiddeldose. Etter transplantasjon hadde pasientene begynt med immundempende behandling i henhold til standard protokoll for nyretransplanterte hvor takrolimus, (metyl) prednisolon, MPA og basiliximab inngikk. Reduksjonen i IMPDH-aktivitet som ble sett etter transplantasjon var som forventet i forhold til MPAs virkningsmekanisme som selektivt hemmer IMPDH. I tidligere forsøk under metodeutviklingen, ble det sett en tendens til at IMPDH-aktiviteten i aktiverte PBMC ble redusert av både CNI (takrolimus og ciklosporin), prednisolon og MPA ved høye konsentrasjoner. Den reduserte IMPDH-aktiviteten i aktiverte celler etter transplantasjon skyldes sannsynligvis den samlede effekten legemidlene har på immunaktivering, men vi antar at effekten av MPA er mest fremtredende. Hvor selektiv IMPDH-aktivitet i stimulerter PBMC er som biomarkør for MPA bør undersøkes nærmere. Det er tidligere vist at MPA reduserer IMPDH-aktiviteten i ustimulerte PBMC fra transplanterte pasienter (57,58). I pilotstudien vår var den interindividuelle variasjonen forholdsvis høy etter transplantasjon hvor 33 ganger variasjon ble observert. Etter transplantasjon vil også pasientenes varierende immunstatus og farmakokinetikk kunne påvirke IMPDH.

I motsetning til høy interindividuell variasjon i IMPDH-aktivitet før transplantasjon, er det observert små intraindividuelle forskjeller (56). Lav intraindividuell variabilitet i forhold til høy interindividuell variabilitet har ført til en hypotese om at genetiske forskjeller står

ansvarlig for mer enn 10 ganger variasjon i IMPDH-aktivitet (59). Preliminære data indikerer at både ikke-genetiske og genetiske faktorer bidrar til de store interindividuelle variasjonene (25). To isoenzymer av IMPDH, IMPDH I og IMPDH II står for den totale aktiviteten til enzymet. En nyere studie som inkluderte pasienter som ble behandlet med MPA, antydte at interindividuell forskjell i IMPDH-aktivitet var relatert til polymorfisme av IMPDH type II (60). Det er i tillegg vist at IMPDH-aktivitet i ustimulerte PBMC før transplantasjon kan relateres til utfallet av en nyretransplantasjon. Høy IMPDH-aktivitet før transplantasjon var assosiert med akutt avstøtning hos nyretransplanterte pasienter, mens lav IMPDH-aktivitet før transplantasjon var assosiert med komplikasjoner i forhold til behandling med MPA. (56).

Basert på medianverdier var nivåene av purinbasene høyest før transplantasjon. Guanin og adenin i aktiverte PBMC ble betydelig redusert etter transplantasjon når pasientene hadde begynt behandlingen med immundempende legemidler. Purinbaser har tidligere blitt undersøkt som spesifikke markører for MPA (43). MPA hemmer IMPDH og fører til nedsatt syntese av guaninnukleotider. Reduksjonen av guanin etter transplantasjon kan av den grunn skyldes effekter av MPA. I aktiverte PBMC fra friske personer i de innledende forsøkene viste både takrolimus, ciklosporin og prednison tegn til å redusere nivåene av både guanin og adenin. Det er sannsynlig at reduksjonen av purinbasene i aktiverte PBMC etter transplantasjon, på lik linje som for IMPDH-aktivitet, skyldes en samlet effekt av alle de immundempende legemidlene som pasientene behandles med. Det var kun marginale forskjeller i guanin – og adeninnivået i stimulerte PBMC ved t_0 og $t_{1,5}$ 6-9 dager og 5-7 uker etter transplantasjon. Ut ifra medianverdier for hypoxantin i aktiverte PBMC, var nivået høyest før transplantasjon. Etter transplantasjon var nivået redusert før inntak av legemiddeldose, men viste en økende tendens ved 1,5 timer etter inntak av legemiddeldose. Ut ifra virkningsmekanismen til MPA kan man tenke seg at opphopning av IMP kan forekomme som følge av hemmet IMPDH-aktivitet. Dette kan være en mulig forklaring til at nivået av hypoxantin har økt 1,5 timer etter inntak av legemiddeldose. I forsøkene hvor legemidlenes effekter på purinbaser ble testet ut, viste både takrolimus, ciklosporin, mykofenolat, sirolimus og everolimus tegn til å øke nivået av hypoxantin. Det kan av den grunn tenkes at økningen i nivået av hypoxantin skyldes den totale effekten av legemidlene som pasientene behandles med.

Det var store interindividuelle variasjoner i nivå av purinbaser mellom pasientene. Opptil 32 ganger variasjon ble observert. I CD4⁺ celler fra friske personer har det også vært observert store interindividuelle variasjoner i nivå av purinbaser (43).

De store interindividuelle variasjonene i IMPDH-aktivitet og purinbaser etter transplantasjon kan skyldes fluktuasjoner i legemiddelkonsentrasjoner og individuell respons på legemidlene. De store forskjellene mellom individer understreker hvor viktig terapeutisk legemiddelmonitorering er for immundempende legemidler for å finne en optimal balanse mellom klinisk effekt og lav forekomst av bivirkninger. IMPDH-aktivitet og purinbaser i ustimulerte lymfocytter er som tidligere nevnt undersøkt som spesifikke markører for MPA. Resultatene våre kan tyde på at det skjer et skifte mot generelle biomarkører når IMPDH-aktivitet og purinbaser måles i stimulerte PBMC. En mulig forklaring er at legemidler som hemmer immunaktivering samtidig vil hemme induksjonen av IMPDH-aktivitet og nivåøkningen av purinbaser. Graden av påvirkning fra de ulike immundempende legemidlene på IMPDH og purinbaser i aktiverte PBMC bør undersøkes mer detaljert med celler fra flere individer. På en slik måte kan biomarkørenes legemiddelselektivitet bestemmes.

6.3.3 Cytokiner i fullblod og PBMC fra nyretransplanterte

Utskillelse av IL-2, IL-6, GM-CSF, IFN- γ og TNF- α ble målt i aktivert fullblod etter 3 og 72 timers inkubering og i aktiverte PBMC etter 72 timers inkubering. Resultatene er basert på prøver som ble tatt før transplantasjon og ved to studiedager etter transplantasjon. Det var ønskelig å sammenlikne cytokinkonsentrasjonene i fullblod i forhold til PBMC for å undersøke eventuelle forskjeller og cellematerialets egnethet til analysen. I hvilket forhold de ulike prøvene ble fortynnet ble valgt på bakgrunn av tidligere forsøk i metodeutviklingen hvor fluorescens ble brukt som mål på cytokinutskillelse. Vi antok at cytokinnivået var lavere i prøvene som var inkubert i 3 timer i forhold til 72 timer og valgte å fortynne disse prøvene i mindre grad. Som resultat av fortynningene kunne konsentrasjonene av cytokinene (pg/mL) brukes som mål på cytokinutskillelse i pasientprøvene. Konsentrasjon vil i et standardisert mål på hvor stor andel av cytokinene som er skilt ut etter *ex vivo* aktivering i forhold til fluorescens. Konsentrasjonen av cytokiner i ustimulert cellemateriale ble ikke målt fordi tidligere forsøk viste at det ikke var mulig.

Konsentrasjonene av IL-2, IL-6 og TNF- α var målbare i både fullblod og PBMC etter henholdsvis 3 og 72 timers inkubering. Imidlertid var flere konsentrasjoner for GM-CSF i fullblod (3 timer) for lave til å bli målt. For IFN- γ i fullblod og PBMC som var inkubert i 72 timer ble flere konsentrasjoner beregnet ved ekstrapolering av kalibreringskurven på grunn av svært høye konsentrasjoner. Vi valgte å inkludere disse resultatene på tross av at konsentrasjonene var usikre. Fullblod (3 timer) ble fortynnet 2 ganger og det vil derfor ikke være mulig å fortynne ytterligere som et tiltak for å kunne måle konsentrasjonen av GM-CSF i fullblod ved 3 timer. Det kan tenkes at GM-CSF ikke egner seg å bli målt i aktivert fullblod etter 3 timers inkubering. Fullblod og PBMC (72 timer) ble fortynnet 10 ganger. En mulighet for å tilpasse konsentrasjonene av IFN- γ til kalibreringskurven, kan være å fortynne prøvene mer siden konsentrasjonene i utgangspunktet ble for høye. Man kan da undersøke om det er mulig å fortynne prøvene før transplantasjon og t_0 -prøvene etter transplantasjon i større grad enn $t_{1,5}$ -prøvene. Et alternativ kan være å analysere IFN- γ som single-plex, altså for seg selv med egen fortynningsgrad. Teknisk og økonomisk sett er det mest gunstig å kunne benytte samme fortynning til prøvene som er av samme prøvemateriale og med lik inkuberingstid.

Yaqoob et al. analyserte i en tidligere studie konsentrasjonene av cytokiner (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, TNF- α , IL-10 og IFN- γ) i både fullblod og PBMC som var aktivert med henholdsvis LPS og conA fra 48 friske personer, med hensikt å undersøke om fullblod kunne egne seg som cellemateriale fremfor PBMC. Studien viste at det var sterk korrelasjon mellom cytokinkonsentrasjonene i fullblod og PBMC og indikerte at fullblod kunne egne seg som cellemateriale til analysen (41). I vår studie var konsentrasjonene av cytokinene generelt høyere i PBMC i forhold til fullblod. Siden det ikke var mulig å sammenlikne cytokinkonsentrasjonene i stimulert cellemateriale med ustimulert cellemateriale for å se relative forskjeller, var forutsetningene for valg av cellemateriale og inkuberingstid at cytokinkonsentrasjonene skulle være målbare, samtidig som legemiddeleffektene i prøvene skulle være bevart. Resultatene indikerte at aktivert fullblod som inkuberes i 3 timer kan egne seg som cellemateriale for å undersøke konsentrasjoner av IL-2, IL-6, IFN- γ og TNF- α i prøver fra nyretransplanterte pasienter som behandles med immundempende legemidler. For å kunne måle konsentrasjonen av GM-CSF kreves lengre inkuberingstid. Det er mest praktisk med lik inkuberingstid for alle prøvene, så alternativet må være å tilpasse analysen til cytokinene som er målbare under samme betingelser og på den måten velge bort de cytokinene som ikke var målbare ved de valgte betingelsene. Etter isolering av PBMC er det observert at legemidler har blitt vasket ut i løpet av isoleringsprosessen (33). Fordelen med å

analysere konsentrasjonen av cytokiner i fullblod fremfor PBMC, er at slik utvasking av legemidler unngås fordi prøvehåndteringen av fullblod ikke innebærer noen form for isolering før aktivering og inkubering. Siden transplanterte pasienter bruker en kombinasjon av immundempende legemidler vil interaksjoner mellom legemidlene og de effektene det har på cytokinutskillelsen være bevart i fullblod. Kontakten mellom alle blodcellene er bevart og det er ingen påvirkning av andre eksogene tilsetninger. Dersom legemidler har blitt vasket ut fra PBMC under isoleringen, kan det ha påvirket cytokinkonsentrasjonen med hensyn til at det ble observert høyere cytokinkonsentrasjon i PBMC sammenlignet med fullblod.

Basert på medianverdi for fem pasienter var konsentrasjonene av alle cytokinene i både fullblod og PBMC ved begge inkuberingstidene høyest før transplantasjon. Pasienten behandles ikke med immundempende legemidler før transplantasjon, og høyest cytokinkonsentrasjon ved dette tidspunktet var dermed forventet. Økningen i cytokinkonsentrasjon etter aktivering av fullblod og PBMC med PMA og ionomycin indikerer at metoden egner seg til analyse av prøver fra nyretransplanterte pasienter. Under metodeutviklingen var forsøkene kun basert på prøver fra friske personer. Det var store forskjeller i cytokinkonsentrasjon mellom de fem pasientene før transplantasjon. Konsentrasjonene varierte mest mellom pasientene for IL-6 i PBMC som var inkubert i 72 timer, hvor 28 ganger variasjon ble observert. Store interindividuelle variasjoner i cytokinutskillelse er også tidligere observert hos friske personer (41).

Etter transplantasjon startet alle pasientene med immundempende behandling, deriblant legemidler som inhiberer både produksjonen av IL-2 og signaleringen via IL-2 reseptoren (ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus). Konsentrasjonen av alle cytokinene i både fullblod og PBMC var som forventet ut i fra legemidlenes virkningsmekanisme tydelig redusert ved første tidspunkt etter transplantasjon (6-9 dager) sammenliknet med nivået før transplantasjon. Cytokinkonsentrasjonen var lavest 1,5 timer etter inntatt legemiddeldose, noe som også var forventet da maksimal konsentrasjon av legemidlene foreligger omtrent ved dette tidspunktet. Samme tendens ble sett ved andre studiedag etter transplantasjon (5-7 uker) når cytokinkonsentrasjonen ble sammenliknet med nivået som var før transplantasjon.

Cytokiner er med på å regulere immunresponsen og kontrollerer blant annet signaleringskaskaden som aktiverer T-celler slik at de differensierer til å bli effektor-T-celler. Cytokinene spiller derfor en sentral rolle i avstøtningsreaksjoner hvor T-celler aktiveres på

grunn av det ukjente organet. Cytokinkonsentrasjoner som måles i prøver fra pasienter før og etter transplantasjon kan tenkes å være nyttig for å se hvordan de ulike pasientene responderer på legemiddelbehandlingen.

Mulige årsaker til store interindividuelle variasjoner kan skyldes både analytisk variasjon og biologiske forskjeller. Variasjoner i antall PBMC som har blitt overført fra celleduspensjon til celledyrkningsrør for aktivering kan også være en mulig årsak. Forbedringer må ta sikte på å sikre at celleduspensjonen er tilstrekkelig blandet før overføring. Fullblod har som tidligere nevnt mange fordeler ved *ex vivo* immunaktivering, men en svakhet er at det er vanskelig å si noe om antallet cytokinproduserende celler som finnes i mengden fullblod som aktiveres og videre analyseres. Det er vist at fysiologiske og patologiske tilstander kan endre antall cytokinproduserende celler og evnen de har til å produsere cytokiner. Pasientene som ble inkludert i pilotstudien har ulike sykdomshistorier. Hver enkelt tilstand som pasientene befinner seg i både før og etter nyretransplantasjon kan bidra til variasjonene som ble observert mellom pasientene med hensyn til cytokinutskillelse.

Farmakokinetiske målinger av de immundempende legemidlene er så langt ikke utført for de fem pasientene. Det skal utføres aktuelle konsentrasjonsmålinger i blod og plasma, samt i isolerte PBMC. Når totale resultater fra de 30 nyretransplanterte foreligger, kan det utføres korrelasjonsanalyser mellom legemiddeleksponering og biomarkører. Biomarkørene skal også vurderes i forhold til forekomst av avstøtningsepisoder og bivirkninger. Med dette som utgangspunkt er det mulig at man kan velge ut noen potensielle biomarkører som kan undersøkes nærmere i en større populasjon av nyretransplanterte.

Siden det ikke ble utført statistiske tester for å vurdere forskjeller, bidrar det til noe usikkerhet i omtalen av resultater. Resultatene varierte i stor grad mellom pasientene og siden det også var et lite antall pasienter ble det ansett som lite hensiktsmessig å utføre statistiske tester. Statistiske analyser kan utføres når data fra alle 30 pasientene foreligger. Resultatene fra de fem pasientene kan også brukes til å vurdere eventuelle modifikasjoner av metodeoppsettet.

7 KONKLUSJON

Det ble utviklet metoder for *ex vivo* immunaktivering av PBMC og fullblod. PMA og ionomycin var generelt best egnet som stimulanter, og kalveserum i dyrkingsmediet kunne erstattes med heparin-plasma fra den kliniske prøven. Metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser ble tydelig økt i aktiverte PBMC etter 72 timer inkubering, og de nevnte biomarkørene kunne kvantifiseres med akseptabel presisjon og reproduserbarhet. Både aktivert fullblod og PBMC var egnet cellemateriale for analyse av cytokinene IL-2, IL-6, GM-CSF, INF- γ og TNF- α .

Metodene kunne anvendes for å måle effekter de immundempende legemidlene har på metabolsk aktivitet (WST-1), IMPDH-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinutskillelse under en immunaktivering. Metabolsk aktivitet fremstår som en generell biomarkør, men på grunnlag av resultatene så langt er det vanskelig å trekke konklusjoner om legemiddelselektiviteten for de andre biomarkørene i *ex vivo* aktiverte lymfocytter. For å gi bedre beskrivelser av hvordan biomarkørene påvirkes av de ulike legemidlene, bør mer omtattende forsøk utføres med blod fra flere individer, samt bør nivåene av biomarkørene sammenholdes med immundempende legemiddeleksponering hos pasienter. De utviklede metodene bør også gjennomgå en grundig analytisk validering.

Kvantifisering av biomarkørene ble utprøvd med blodprøver fra fem nyretransplanterte pasienter som ble inkludert i en pilotstudie. Det var mulig å konstruere individuelle responskurver for CsA, takrolimus, MPA, sirolimus og everolimus basert på aktiverte PBMC før transplantasjon. Den etablerte metoden egnet seg ikke til å lage responskurver for prednisolon. Etter transplantasjon ser det ut til at det er tilstrekkelig å måle aktiveringsgraden i PBMC ved t_0 , siden det ikke kunne observeres noen tydelig forskjell i aktiveringsgrad mellom t_0 og $t_{1,5}$.

IMPDH-aktivitet og nivåene av guanin og adenin ble redusert i aktiverte PBMC etter transplantasjon. Mens IMPDH-aktiviteten var lavere ved $t_{1,5}$ i forhold til t_0 etter transplantasjon, var det kun marginale forskjeller i nivå av purinbaser ved samme tidspunkt. Ved å måle aktiviteten av IMPDH ved både t_0 og $t_{1,5}$ vil man sannsynligvis få et bedre mål på legemiddeleffekten enn om man kun benytter t_0 .

Det var mulig å måle cytokinkonsentrasjoner i både aktivert fullblod og aktiverte PBMC fra pasientene. Det så ut til å være stor samvariasjon mellom cytokinkonsentrasjonene i begge cellematerialene. Med hensyn til at fullblod inneholder alle blodets komponenter, inkludert legemidler og metabolitter, i tillegg til at prøvehåndteringen er enklere og mindre tidkrevende i forhold til PBMC, bør aktivert fullblod foretrekkes som cellemateriale til analyse av cytokiner. Ved å tilpasse fortynningene av supernatant er det sannsynlig at konsentrasjonene til alle cytokinene kan måles i aktivert fullblod etter 72 timers inkubering. Enkelte av cytokinene, deriblant IL-2, kunne også måles etter 3 timers stimulering av fullblod.

Alle de undersøkte biomarkørene varierte i stor grad mellom pasientene. Når resultater fra hele studiepopulasjonen foreligger bør korrelasjonsanalyser mellom legemiddeleksponering og biomarkører utføres, og man bør undersøke biomarkørenes sammenheng med kliniske endepunktersom forekomst av bivirkninger og avstøtningsepisoder. Deretter bør potensielle biomarkører velges ut og undersøkes i en større populasjon av nyretransplanterte. Den endelige målsetningen vil være å vise kliniske nytteverdi av den farmakodynamiske legemiddelmonitoreringen.

REFERANSER

1. Store norske leksikon. <http://snl.no/transplantasjon> (tilgjengelig 11.5.2012).
2. Parham, P. (2009). "The immune system.", 3.utg. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business, New York og London.
3. Thorsby, E. (2006). "[Transplantation medicine in Norway through 50 years]." Tidsskr Nor Laegeforen. 126: 3305-3310.
4. Bakkan, P.A. (2011). "Årsrapport organdonasjon og transplantasjon 1.januar - 31.desember 2011." Oslo universitetssykehus HF.
5. Nyretransplantasjon.
<http://www.oslouniversitetssykehus.no/pasient/behandlinger/Sider/nyretransplantasjon.aspx> (tilgjengelig 2.5.2012).
6. Heiwe, S., Midtvedt, K. (2012). "Aktivitetshåndboken: Nyresykdom og nyretransplantasjon." Helsedirektoratet,
7. Westlie, L., Leivestad, T., Holdaas, H., Lien, B., Hartmann, A., Fauchald, P. (2003). "[Is current practice concerning living donors in kidney transplantations acceptable?]." Tidsskr Nor Laegeforen. 123: 1063-1065.
8. Bogen, B., Munthe, A.L. (2002). "Immunologi.", 2.utg, Universitetsforlaget, Oslo,
9. Protokoll for nyre-transplantasjon og pancreas-transplantasjon ved Rikshospitalet (2012). Oslo universitetssykehus HF.
10. Issa, F., Schiopu, A., Wood, K.J. (2010). "Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance." Expert Rev Clin Immunol. 6: 155-169.
11. Alonso, A.R., Lopez-Vazquez, A., Lopez-Larrea, C. (2012). "Imunology and the challenge of transplantation." Adv Exp Med Biol. 741: 27-43.
12. Remuzzi, G., Chiaramonte, S., Perico, N., Ronco, C. (2009). "Humoral immunity in kidney transplantation: what clinicians need to know. Preface." Contrib Nephrol. 162: vii-vix.
13. Kahan, B.D., Keown, P., Levy, G.A., Johnston, A. (2002). "Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice." Clin Ther. 24: 330-350.
14. Wieland, E., Olbricht, C.J., Susal, C., Gurragehaa, P., Bohler, T., Israeli, M., et al. (2010). "Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients." Ther Drug Monit. 32: 560-572.

15. Oppl, B., Kofler, A., Schwarz, S., Rainer, J., Kofler, R. (2011). "Establishing a sensitive and specific assay for determination of glucocorticoid bioactivity." *Wien Klin Wochenschr.* 123: 222-229.
16. Haufroid, V., Mourad, M., Van, K., V, Wawrzyniak, J., De, M.M., Eddour, D.C., et al. (2004). "The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients." *Pharmacogenetics.* 14: 147-154.
17. Farmakologiske analyser. <http://www.anx.no/> (tilgjengelig 8.5.2012).
18. Wallemacq, P.E. (2004). "Therapeutic monitoring of immunosuppressant drugs. Where are we?" *Clin Chem Lab Med.* 42: 1204-1211.
19. Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." *Drugs.* 67: 369-391.
20. Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok (2010). "Norsk legemiddelhåndbok." Oslo.
21. Everolimus. <http://www.felleskatalogen.no/medisin> (tilgjengelig 8.5.2012).
22. Hutchinson, P., Jose, M., Atkins, R.C., Holdsworth, S.R. (2004). "Ex vivo lymphocyte proliferative function is severely inhibited in renal transplant patients on mycophenolate mofetil treatment." *Transpl Immunol.* 13: 55-61.
23. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group (1995). "Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection." *Lancet.* 345: 1321-1325.
24. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group (1996). "A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation." *Transplantation.* 61: 1029-1037.
25. de, J.H., Naesens, M., Kuypers, D.R. (2009). "New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation." *Ther Drug Monit.* 31: 416-435.
26. Mele, T.S., Halloran, P.F. (2000). "The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients." *Immunopharmacology.* 47: 215-245.
27. Staatz, C.E., Tett, S.E. (2007). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients." *Clin Pharmacokinet.* 46: 13-58.

28. Johnston, A., Holt, D.W. (1999). "Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs." *Br J Clin Pharmacol.* 47: 339-350.
29. Rang, H.P., Dale, J.M. (2007). "Rang and Dale's Pharmacology.", 6.utg Elsevier Science Health Science div,
30. Oellerich, M., Armstrong, V.W. (2006). "The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments." *Ther Drug Monit.* 28: 720-725.
31. Ohdan, H. (2010). "Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients." *Clin Pharmacol Ther.* 87: 23-26.
32. Kurata, Y., Kato, M., Kuzuya, T., Miwa, Y., Iwasaki, K., Haneda, M., et al. (2009). "Pretransplant pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using CFSE-based T-cell proliferation assay." *Clin Pharmacol Ther.* 86: 285-289.
33. Bohler, T., Nolting, J., Kamar, N., Gurragehaa, P., Reisener, K., Glander, P., et al. (2007). "Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans." *Ther Drug Monit.* 29: 77-86.
34. Hirano, T. (2007). "Cellular pharmacodynamics of immunosuppressive drugs for individualized medicine." *Int Immunopharmacol.* 7: 3-22.
35. Tan, A.S., Berridge, M.V. (2000). "Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents." *J Immunol Methods.* 238: 59-68.
36. Zimmermann, A.G., Gu, J.J., Laliberte, J., Mitchell, B.S. (1998). "Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 61: 181-209.
37. Albrecht, W., Storck, M., Pfetsch, E., Martin, W., Abendroth, D. (2000). "Development and application of a high-performance liquid chromatography-based assay for determination of the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in whole blood and isolated mononuclear cells." *Ther Drug Monit.* 22: 283-294.
38. Glander, P., Braun, K.P., Hambach, P., Bauer, S., Mai, I., Roots, I., et al. (2001). "Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells." *Clin Biochem.* 34: 543-549.
39. Vethe, N.T., Bergan, S. (2006). "Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+ cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy." *Ther Drug Monit.* 28: 608-613.

40. Vethe, N.T., Mandla, R., Line, P.-D., Midtvedt, K., Hartmann, A., Bergan, S. (2006). "Inosine monophosphate dehydrogenase activity in renal allograft recipients during mycophenolate treatment." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 66 (1) (pp 31-44), 2006 Date of Publication: Feb 2006. 2006.
41. Yaqoob, P., Newsholme, E.A., Calder, P.C. (1999). "Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells." *Cytokine*. 11: 600-605.
42. Sullivan, K.E., Cutilli, J., Piliero, L.M., Ghavimi-Alagha, D., Starr, S.E., Campbell, D.E., et al. (2000). "Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells." *Clin Diagn Lab Immunol*. 7: 920-924.
43. Vethe, N.T., Bremer, S., Rootwelt, H., Bergan, S. (2008). "Pharmacodynamics of mycophenolic acid in CD4+ cells: a single-dose study of IMPDH and purine nucleotide responses in healthy individuals." *Ther Drug Monit*. 30: 647-655.
44. Chakrabarti, R., Kumar, S., Chakrabarti, R. (1999). "Relative roles of T-cell receptor ligands and interleukin-2 in driving T-cell proliferation." *J Cell Biochem*. 76: 37-43.
45. Perles, B., Flanagan, M.T., Auger, J., Crumpton, M.J. (1977). "Mechanism of lymphocyte activation: the binding of phytohemagglutinin to the lymphocyte surface." *Eur J Immunol*. 7: 613-619.
46. Valentine, M.A., Tsoukas, C.D., Rhodes, G., Vaughan, J.H., Carson, D.A. (1985). "Phytohemagglutinin binds to the 20-kDa molecule of the T3 complex." *Eur J Immunol*. 15: 851-854.
47. Wolfson, M., McPhail, L.C., Nasrallah, V.N., Snyderman, R. (1985). "Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme." *J Immunol*. 135: 2057-2062.
48. Mason, M.J., Grinstein, S. (1993). "Ionomycin activates electrogenic Ca²⁺ influx in rat thymic lymphocytes." *Biochem J*. 296 (Pt 1): 33-39.
49. Chaudhri, G., Hunt, N.H., Clark, I.A., Ceredig, R. (1988). "Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin." *Cell Immunol*. 115: 204-213.
50. Kronke, M., Leonard, W.J., Depper, J.M., Arya, S.K., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., et al. (1984). "Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81: 5214-5218.

51. Fleiner, F.H. (2010). "Responsmarkører for immundempende behandling hos transplanterte: Utvikling av metode for kvantifisering av immuncellers aktiveringskapasitet." Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Oslo.
52. Bead-based multiplexing of up to 500 analytes per well. <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/index.htm> (tilgjengelig 8.5.2012).
53. Store norske leksikon. http://snl.no/.sml_artikkel/hemolyse (tilgjengelig 1.5.2012).
54. Jackson, R.C., Weber, G., Morris, H.P. (1975). "IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy." *Nature*. 256: 331-333.
55. Ali, M.A. (2011). "Molekylær farmakodynamikk hos levertransplanterte: IMPDH og purinbaser som mulige biomarkører for mykofenolats effekt." Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Oslo.
56. Glander, P., Hambach, P., Braun, K.P., Fritsche, L., Giessing, M., Mai, I., et al. (2004). "Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation." *Am J Transplant*. 4: 2045-2051.
57. Langman, L.J., LeGatt, D.F., Halloran, P.F., Yatscoff, R.W. (1996). "Pharmacodynamic assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression in renal transplant recipients." *Transplantation*. 62: 666-672.
58. Glander, P., Hambach, P., Braun, K.P., Fritsche, L., Waiser, J., Mai, I., et al. (2003). "Effect of mycophenolate mofetil on IMP dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients." *Int J Clin Pharmacol Ther*. 41: 470-476.
59. Glander, P., Hambach, P., Liefeldt, L., Budde, K. (2011). "Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker in the field of transplantation." *Clin Chim Acta*.
60. Sombogaard, F., van Schaik, R.H., Mathot, R.A., Budde, K., van der, W.M., Vulto, A.G., et al. (2009). "Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism." *Pharmacogenet Genomics*. 19: 626-634.

APPENDIX

Appendix I; Pasientenes informasjonsskriv

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet: *Molekylære biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte: En pilotstudie*

Bakgrunn og hensikt

Dette er et spørsmål til deg om å delta i en forskningsstudie hvor nye prinsipper for å måle biologiske markører skal undersøkes. Studien vil gi ny kunnskap om immundempende legemidlers virkemekanisme hos nyretransplanterte, og den vil danne grunnlag for en større studie der sammenhenger mellom biologiske markører og immundempende legemiddeleffekt skal kartlegges. Pasienter over 18 år som skal motta nyre fra en levende donor ved Oslo universitetssykehus, blir spurt om å delta i denne pilotstudien som Oslo universitetssykehus er ansvarlig for.

Hva innebærer studien?

I forbindelse med den rutinemessige blodprøvetakingen vil det bli tatt ekstra blodprøveglass (18,5 mL) ved fire anledninger: før nyretransplantasjon, samt 6-9 dager, 5-7 uker og 1 år etter transplantasjon. Prøvene tas på morgenen like før dosering av immundempende legemidler. De som bruker legemidlet takrolimus (Prograf® eller Advagraf®), blir også spurt om å gi blodprøve 1,5 timer etter dosering, noe som kommer i tillegg til rutineprøvetakingen. Analyser av biomarkører (DNA, RNA, proteiner, metabolitter) og legemiddelnivåer vil bli utført. Eventuelle avstøtningsepisoder, bivirkninger, legemiddeldoser og nyrefunksjon vil bli registrert. Uavhengig av om man blir med eller ikke blir med i studien, så følger man samme standard behandling ved Oslo universitetssykehus.

Mulige fordeler og ulemper

Resultatene fra studien kan senere komme pasientgruppen av nyretransplanterte til gode ved at bedre diagnostiske metoder utvikles. Den enkelte studiedeltaker vil ikke oppnå direkte fordeler. Deltakelse innebærer at et ekstra blodvolum tappes i prøveglass ved fire anledninger. Dette medfører ingen risiko for pasientene. Studiens prøvetaking skjer i forbindelse med rutinemessig prøvetaking.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Det er kun autorisert personell knyttet til prosjektet som har adgang til navnelisten og som kan finne tilbake til deg. Prøvemateriale og pasientinformasjon som samles inn, skal destrueres og slettes senest innen utgangen av år 2030. Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dette vil ikke få konsekvenser for din videre behandling. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Om du nå sier ja til å delta, kan du senere trekke tilbake ditt samtykke uten at det påvirker din øvrige behandling. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til studien, kan du kontakte klinisk ansvarlig overlege Karsten Midtvedt (tlf. 23 07 18 94) eller prosjektleder professor Stein Bergan (tlf. 22 84 02 91).

Ytterligere informasjon om studien finnes i kapittel A – utdypende forklaring av hva studien innebærer.

Ytterligere informasjon om biobank, personvern og forsikring finnes i kapittel B – Personvern, biobank, økonomi og forsikring.

Samtykkeerklæring følger etter kapittel B.

Kapittel A-utdypende forklaring av hva studien innebærer

- **Kriterier for deltakelse**

Deltakelse er frivillig og kan skje etter at skriftlig informert samtykke er undertegnet. Pasienter over 18 år som skal transplanteres med en nyre fra levende giver ved Oslo universitetssykehus, blir spurt om å bli med i studien.

- **Bakgrunn for studien**

Etter en nyretransplantasjon bruker man en kombinasjon av immundempende legemidler for å hindre at kroppens immunforsvar angriper det nye organet. Siden effekten av en spesifikk legemiddeldose varierer mellom pasienter er det ofte nødvendig å måle hvor mye legemiddel som er i pasientens blod. Et nyere prinsipp som er under utvikling, er å ta blodprøver for å måle biologiske markører som mer direkte beskriver det immundempende legemidlets effekt. Slike biomarkører kan ha utgangspunkt i sekvenser av arvestoffet DNA eller arvestoffets genuttrykk i form av RNA, eller de kan være proteiner og andre molekyler som er involvert i pasientens immun- og legemiddelrespons.

Formålene med denne pilotstudien er å videreutvikle prinsippene for målinger av biomarkører hos nyretransplanterte, å frembringe ny kunnskap om immundempende legemidlers virkemekanisme, samt å frembringe hypoteser om sammenheng mellom biomarkører og klinisk effekt. Totalt skal 30 nyretransplanterte pasienter inkluderes i pilotstudien. Resultatene vil senere bli fulgt opp i en større studie.

- **Blodprøvetaking og undersøkelser**

Ekstra venøse blodprøver (18,5 mL) vil bli tatt i forbindelse med rutinemessig blodprøvetaking ved fire anledninger. Analyser av biologiske molekyler (DNA, RNA, proteiner, metabolitter) og legemiddelkonsentrasjoner vil bli utført. Opplysninger om kjønn, alder, vekt, høyde, eventuelle avstøtningsepisoder og bivirkninger, legemiddeldoser og nyrefunksjon vil bli registrert.

- **Tidsskjema**

I forbindelse med studien vil blodprøver bli tatt innenfor disse tidsrommene:

- 0 til 4 dager før nyretransplantasjon
- 6-9 dager etter nyretransplantasjon
- 5-7 uker etter nyretransplantasjon
- 1 år etter nyretransplantasjon

Blodprøvene tas på morgenen like før legemiddeldose inntas. De som bruker det immundempende legemidlet takrolimus (Prograf® eller Advagraf®), blir i tillegg spurt om å gi blodprøve 1,5 timer etter dosering.

- **Mulige fordeler**

Resultatene fra studien kan senere komme nyretransplanterte pasienter til gode ved at bedre diagnostiske metoder utvikles. Kartlegging av sammenhenger mellom biologiske markører og klinisk effekt av immundempende behandling etter transplantasjon kan på sikt medføre en mer individuelt tilpasset, forbedret behandling. Den enkelte pasient vil ikke oppnå direkte fordeler under deltakelsen i studien.

- **Bivirkninger**

Studien innebærer ikke risiko for ekstra bivirkninger.

- **Mulige ulemper**

I studien tappes et ekstra blodvolum på 18,5 mL i prøveglass ved hver studieprøvetaking. Dette er et lite volum som ikke medfører risiko for pasientene. Studiens prøvetaking skjer i forbindelse med rutinemessig prøvetaking.

Kapittel B - Personvern, biobank, økonomi og forsikring

Personvern

Opplysninger som registreres om deg er kjønn, alder, vekt, høyde, etnisk opphav (eks. kaukasier, asiat, afrikaner), matching av vevstype mellom donor og deg som mottaker av transplantat, eventuelle tidligere transplantasjoner, legemiddeldoser som brukes under studieforløpet, eventuelle avstøtningsepisoder og bivirkninger, samt nyrefunksjon. Opplysninger registreres fra rutinemessige biokjemiske og hematologiske analyser som er relevant for studiens hensikt, samt fra studiens biomarkør- og legemiddelanalyser. Biologiske markører som undersøkes vil være gensekvenser og sammensetning i arvestoffet DNA, spesifikke genuttrykk målt som RNA, samt spesifikke proteiner, peptider og metabolitter. Legemidler og legemiddelmetabolitter analyseres i blod, blodceller og blodplasma. Studiens analyser er begrenset til biologiske markører og legemidler som er relevante for immunstatus og effekt av immundempende legemidler etter nyretransplantasjon.

Oslo universitetssykehus ved administrerende direktør er databehandlingsansvarlig.

Biobank

Prøvene som blir tatt i studien og informasjonen utledet av dette materialet vil bli lagret i en forskningsbiobank ved Oslo universitetssykehus. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Wenche Reed ved Oslo universitetssykehus er ansvarshavende for forskningsbiobanken. Biobanken planlegges å vare til utgangen av år 2030. Etter dette vil materiale og opplysninger bli destruert og slettet etter interne retningslinjer.

Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Økonomi

Studien og biobanken er finansiert gjennom forskningsmidler fra Oslo universitetssykehus.

Enkelte analyser av det lagrede forskningsmaterialet i biobanken kan bli finansiert gjennom tildeling av frie forskningsmidler fra myndigheter eller fond/legater. Imidlertid vil det ikke bli anvendt midler fra noen ekstern sponsor som kan ha økonomiske interesser i prosjektet.

Forsikring

Standard forsikringsordninger ved Oslo universitetssykehus gjelder for deltakere i studien.

Informasjon om utfallet av studien

Deltakere i studien har rett til å bli informert om oppsummerte, avidentifiserte resultater fra studien. Dette vil bli gjort på direkte forespørsel. Resultater tilhørende den enkelte pasient vil ikke oppgis siden studien ikke er designet for å konkludere med hensyn til sammenhenger mellom undersøkte markører og klinisk utfall etter nyretransplantasjon. Resultatene vil bli publisert i avidentifisert form i internasjonale tidsskrifter.

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)